

ASSOZIATION VON GENOTYP UND PHÄNOTYP BEI NON-SYNDROMALEN OLIGODONTIEN

SARAH JABIR



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

ASSOZIATION VON GENOTYP UND PHÄNOTYP BEI NON-SYNDROMALEN OLIGODONTIEN

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Sarah Jabir
aus Korbach

Gießen 2014

Aus dem Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
Poliklinik für Kieferorthopädie
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Direktorin: Prof. Dr. Sabine Ruf

Gutachterin: Prof. Dr. Sabine Ruf

Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Müller

Tag der Disputation: 5. Mai 2015

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Allgemeine Einleitung.....	1
1.1	Prävalenz von Nichtanlagen bleibender Zähne.....	4
1.2	Ursachen von Nichtanlagen.....	5
1.3	Gliederung und Aufbau der Arbeit.....	8
Teil I	Genetischer Hintergrund non-syndromaler Oligodontien – ein systematisches Review mit Meta-Analyse	10
	Inhaltsverzeichnis.....	11
I.1	Ergebnisse, Schlussfolgerung und Stellung der Publikation.....	12
I.2	Detaillierte Erläuterung: Tooth Agenesis Code	14
I.3	WNT10A Mutationen: Inhaltlicher Zusammenhang der Ergänzungen ..	15
I.4	Ergänzung Material und Methode	17
I.5	Ergänzung Ergebnisse	18
I.6	Ergänzung Diskussion	20
	Zusammenhang der Teile I und II in der Dissertation	21
Teil II	Assoziation von Genotyp und Phänotyp bei non-syndromalen Oligodontien.....	22
	Inhaltsverzeichnis.....	23
II.1	Spezielle Einleitung	24
II.2	Ziel der Arbeit	25
II.3	Material und Methode	26
II.3.1	Allgemeiner Ablauf	26
II.3.2	Erhalt des genetischen Materials.....	27
II.3.3	DNA-Amplifizierung und Sequenzierung	29
II.3.4	Statistische Methoden	31

II.4	Ergebnisse	32
II.4.1	Genotyphypothese	35
II.4.2	Beschreibung der Patienten/Familien/Genmutationen	39
II.4.2.1	Verdachtsdiagnose MSX1-Mutation	40
II.4.2.2	Verdachtsdiagnose EDA-Mutation	58
II.4.2.3	Verdachtsdiagnose AXIN2-Mutation	67
II.5	Diskussion	68
2	Zusammenfassungen/Summaries	91
2.1	Zusammenfassung Teil I	92
2.2	Summary Part I.....	94
2.3	Zusammenfassung Teil II	96
2.4	Summary Part II.....	98
3	Literaturverzeichnis.....	100
4	Anhang	117
4.1	Primersequenzen	118
4.2	PCR-Ansätze MSX1, EDA und AXIN2.....	119
4.3	Familienbeschreibung der Familien ohne Genmutation	120
4.3.1	Verdachtsdiagnose MSX1-Mutation	120
4.3.2	Verdachtsdiagnose EDA-Mutation	145
4.3.3	Verdachtsdiagnose AXIN2-Mutation	157
5	Publikationsverzeichnis	167
6	Ehrenwörtliche Erklärung.....	209
7	Danksagung	210
—	Legende Familienstammbaum	212

1 Allgemeine Einleitung

1 Allgemeine Einleitung

Eine Nichtanlage oder Aplasie beschreibt das Fehlen von Zähnen der ersten und/oder zweiten Dentition und ist die am häufigsten auftretende dentale humane Anomalie (Nunn et al. 2003, Vastardis et al. 1996).

Man unterscheidet Hypo- und Oligodontien von Anodontien. Die Grenze zwischen Hypo- und Oligodontie ist in der Literatur nicht eindeutig festgelegt. Häufig wird neben dem Begriff „oligodontia“ auch von „severe hypodontia“ gesprochen. Die momentan anerkannteste Definition ist die nach Schalk-van der Weide (1992). Hiernach liegt eine Hypodontie vor, wenn ein bis fünf bleibende Zähne kongenital fehlen, wohingegen eine Oligodontie bei mindestens sechs kongenital fehlenden Zähnen der permanenten Dentition besteht. Diese Definition findet auch für die vorliegende Arbeit Anwendung. Das Fehlen von Weisheitszähnen wird in der Definition gemäß Schalk-van der Weide (1992) sowie in der vorliegenden Dissertationsschrift nicht berücksichtigt.

Wichtig ist, dass der Begriff *kongenital* mit Vorsicht betrachtet werden muss, da sich einige Zähne erst nach der Geburt entwickeln (Nieminen 2007), jedoch ist der Begriffszusatz dennoch sinnvoll, da angelegte aber verloren gegangene Zähne in keinem Fall die Einstufung in eine „Hypo“- oder „Oligodontia Vera“ rechtfertigen. Eine Anodontie beschreibt das gesamte kongenitale Fehlen einer oder beider Dentitionen.

Je mehr Zähne vor allem der bleibenden Dentition nicht angelegt sind, desto komplexer, langwieriger und kostenintensiver wird die zahnmedizinische Behandlung eines Patienten und desto schlechter gleichzeitig auch die Behandlungsprognose. Aus diesem Grund sind vor allem sogenannte Oligodontien von kieferorthopädischem sowie allgemein-zahnmedizinischem Interesse. Daher beschränkt sich die vorliegende Dissertationsschrift auf die Analyse von Oligodontien in der bleibenden Dentition.

Eine Oligodontie kann isoliert oder im Rahmen eines Syndroms auftreten. Unter einem Syndrom versteht man das gleichzeitige Vorliegen verschiedener Symptome deren ätiologischer Zusammenhang mehr oder weniger bekannt ist oder vermutet werden kann (<http://de.wikipedia.org/wiki/Syndrom>).

Syndrome, bei denen häufig Nichtanlagen zu finden sind, sind beispielsweise das Downsyndrom, das Riegersyndrom und das Charsyndrom (Dental Genetics Group, www.helsinki.fi/science/dentgen/bg.html). Ebenso sind bei Lippen-Kiefer-Gaumenspalten in den meisten Fällen Aplasien (vor allem im Bereich der Spalte, aber auch in anderen Regionen) vorhanden. Bartzela et al. (2013) beschreiben verschiedene Nichtanlagemuster bei Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. Häufig lassen sich auch syndromtypische Nichtanlagemuster erkennen (Nieminen 2007).

Interessant ist dabei aber vor allem die Grenze zwischen syndromalen und non-syndromalen Oligodontien. Bei der hypohydrotischen ektodermalen Dysplasie zum Beispiel, welche in einem Gendefekt des EDA-Gens begründet liegt, findet sich eine Symptommhäufung durch eine komplexe Differenzierungsstörung der Gewebe ektodermaler Herkunft. Es treten Oligodontie, Hypotrichose und Hypohydrose auf. Die Patienten haben durch einen Mangel an Schweißdrüsen Probleme, die Körpertemperatur zu regulieren. Es kann daher zu Hyperthermien kommen, die in extremen Fällen als Folge des Fiebers zum frühen Kindstod führen können (Mues et al. 2009). Es gibt aber auch isolierte Oligodontien, die durch Mutationen im EDA-Gen hervorgerufen werden und definitionsgemäß keine weitere oder keine eindeutige syndromale Symptomatik zeigen. Auch für MSX1-Mutationen lassen sich solche fließenden Übergänge erkennen. Bei schwächer ausgeprägtem Genotyp finden sich „lediglich“ Oligodontien, bei stärkeren Ausprägungen auch Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten in Verbindung mit Oligodontien.

Derartige fließende Übergänge zwischen non-syndromalen und syndromalen Oligodontieformen sind vermutlich die Folge einer „Schwellenwertüberschreitung“ hinsichtlich des Ausmaßes des Funktionsverlustes der mutationsbedingt abnormalen Proteinstruktur (Mues et al. 2009, Mues et al. 2010). Ausschlaggebend ist, inwiefern das resultierende Protein durch die Mutation in seiner Funktion beeinträchtigt ist. Patienten, bei denen die Mutation zu nicht funktionsfähigen Proteinen führt, zeigen das Vollbild eines Syndroms, so z.B. der hypohydrotischen ektodermalen Dysplasie (Kere et al. 1996, Mues et al. 2010). Liegt eine Form vor, bei der das Protein in seiner Funktion kaum verändert ist, entstehen isolierte Oligodontien. Dies hat wiederum zur Folge, dass eine Mutation bis zum Zeitpunkt des Zahnwechsels oder der Kontrolle durch den Hauszahnarzt oder den Kieferorthopäden unerkannt geblieben ist.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf isolierte, non-syndromale Oligodontien, da diese Indikatoren für andere Erkrankungen sein könnten.

1.1 Prävalenz von Nichtanlagen bleibender Zähne

In der permanenten Dentition der kaukasischen Bevölkerung fehlen bei vorliegender Hypoplasie Weisheitszähne zu 20-25%, wohingegen die Angaben über Aplasien der anderen Zähne zwischen 6% und 9% variieren (Schopf 2008). Am häufigsten sind Nichtanlagen der zweiten oberen und unteren Prämolaren sowie der oberen lateralen Inzisiven. Das Fehlen anderer Zähne tritt deutlich seltener auf (Schopf 2008). Es zeigt sich eine Variation zwischen verschiedenen Populationen. Bei der asiatischen Bevölkerung fehlen beispielsweise die unteren mittleren Schneidezähne am häufigsten (Nieminen 2007).

Nichtanlagen sind bei 2-10% der Bevölkerung zu finden (Kjaer 1994). Auch diese Angaben differieren zwischen den verschiedenen Populationen. Die nordamerikanische (keine prozentuale Angabe) und die saudi-arabische Bevölkerung (2,2-4%) weisen im Vergleich zu Kaukasiern insgesamt weniger Nichtanlagen auf (Nieminen 2007, Polder et al. 2004). Polder et al. (2004) stellen fest, dass Afroamerikaner eine den Kaukasiern vergleichbare Prävalenz zeigen. In einer Untersuchung von Celikoglu et al. (2010) wurde die Prävalenz in einem türkischen kieferorthopädischen Patientengut ermittelt: Sie lag bei 4,3% für Hypodontien.

Die Prävalenz für Oligodontien liegt zwischen 0,14% und 0,17% (Polder et al. 2004, Rolling et al. 2001). In selektierten kieferorthopädischen Patientengruppen finden sich Werte zwischen 0,09% und 1,99% (Behr et al. 2011, Celikoglu et al. 2010 und Silverman et al. 1979). Celikoglu et al. (2010) ermittelten eine Prävalenz von 0,3% in einem türkischen kieferorthopädischen Patientengut.

1.2 Ursachen von Nichtanlagen

Die Ursache für Nichtanlagen von Zähnen ist nicht zweifelsfrei geklärt. Hereditäre Faktoren spielen eine große Rolle: Nichtanlagen werden oft vererbt, dies zeigt sich in der familiären Häufung und den erhöhten Konkordanzraten von Aplasien eineiiger Zwillinge (Lapater et al. 1998, Marcovic et al. 1982).

Aplasien finden sich außerdem wie bereits erwähnt bei vorliegenden syndromalen Entwicklungsstörungen (Morbus Down (Suri et al. 2011), Dysostosis mandibulo-facialis und Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (Bartzela et al. 2013, Schopf 2008)).

Weitere Gründe für Nichtanlagen sind Infektionen im Kieferknochen, Virusinfektionen, Traumata im Milchgebiss oder Bestrahlung basierend auf kanzerösen Erkrankungen (Schopf 2008). Eine Rötelnembryopathie kann ebenso Aplasien nach sich ziehen (Diedrich 2000).

Eine weitere Vermutung ist die der phylogenetische Reduktion (Schopf 2008): Im Laufe der Entwicklung kommt es zu Rückbildungen derjenigen Organe und Strukturen, die der Mensch kaum benötigt. Riethe (1959) hingegen argumentiert, dass „Verkümmerungen und Nichtanlagen [...] nur „dezimierten rezenten Kiefern“ zugeschrieben“ werden. [...] Fehlbildungen [...] haben ihre Ursache in der genotypisch bedingten Disharmonie zwischen Zahn- und Kiefergröße, Alveolar- und Basalteil.

Svinhufvud et al. (1988) sehen die Nichtanlage von zweiten Molaren, zweiten Prämolaren und oberen seitlichen Inzisiven in einem Zusammenhang zwischen der anatomischen Lage, der damit verbundenen Lage am Ende eines Innervationsastes und der Durchbruchreihenfolge begründet. Kjaer (1999) geht ebenfalls davon aus, dass die nicht angelegten Zähne bevorzugt am Ende eines Innervationsastes liegen. Eine weitere Arbeit von Kjaer et al. aus dem Jahr 1994 beschreibt den Zusammenhang zwischen Nichtanlage und fehlendem Mandibularkanal: Bei Aplasie des Canalis mandibularis fehlt in diesem Bereich gleichzeitig die Innervation. Dies wiederum kann mit einer Aplasie der Zähne in dieser Region assoziiert sein.

Ein Grund für verschiedene Prävalenzen der Aplasie von Milch- und bleibenden Zähnen ist das voranschreitende Unterkieferwachstum (Kjaer et al. 1994). Durch eine Zunahme von Knochensubstanz um die innervierenden Nerven ist der Zahnkeim des

bleibenden Zahnes in größerer Distanz zum Innervationsort als der des Milchzahnes lokalisiert. So lässt sich erklären, dass bei Nichtanlage der Milchzähne in der Regel auch die bleibenden Zähne fehlen, dass aber eine Nichtanlage von bleibenden Zähnen bei vollständigem Milchgebiss vorliegen kann.

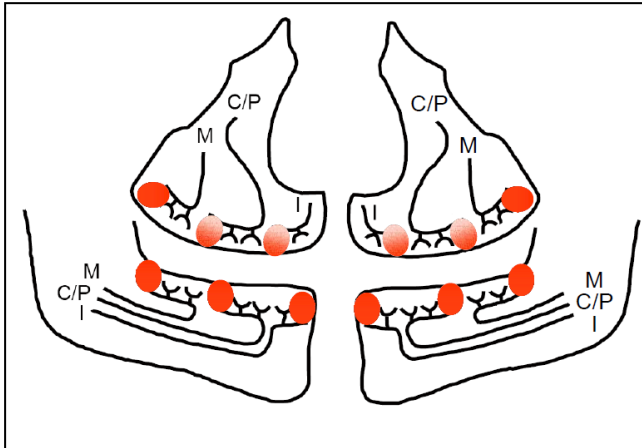


Abb. 1.2.1: Nichtanlagen finden sich häufig am Ende des jeweils innervierenden Nervs (Kjaer 1999).

Genotyp-Phänotyp Assoziationen

Die Entwicklung der Zähne wird zu einem überwiegenden Teil genetisch kontrolliert (Thesleff et al. 2003). Über 200 Gene werden im Zuge der Zahnentwicklung exprimiert (Thesleff et al. 2006). In der Literatur werden insbesondere Mutationen von vier Genen (Paired-Box-Gen 9 = PAX9, Muscle segment homeobox-Protein 1 = MSX1, Ektodysplasin-A = EDA, Axis inhibition Protein 2 = AXIN2) im Zusammenhang mit non-syndromalen Oligodontien beschrieben (Das et al. 2002, Das et al. 2003, De Muynck et al. 2004, Hansen et al. 2007, Li et al. 2008, Mues et al. 2010). Ihre Auswirkungen auf die Dentition bzw. das Nichtanlagenmuster sind durchaus unterschiedlich (Mues et al. 2009). Während Veränderungen der PAX9-Gensequenz vorwiegend ein Fehlen von Molaren (Das et al. 2002, Das et al. 2003, Frazier-Bowers et al. 2002, Jumlongras et al. 2001, Lammi et al. 2003, Nieminen et al. 2001, Stockton et al. 2000) bewirken, wird für MSX1-Mutationen vor allem ein Fehlen von Prämolaren (Kapadia et al. 2006, Vieira et al. 2004) beschrieben. Demgegenüber zeigen Patienten mit einer AXIN2-Mutation eine große Zahnunterzahl sowohl im Molaren- als auch im Prämolarenbereich (Lammi et al. 2004). Die EDA-assoziierten non-syndromalen Oligodontien äußern sich hingegen überwiegend durch ein Fehlen von Inzisiven (Ayub et al. 2010, Han et al.

2008, Mues et al. 2009, Mues et al. 2010, Song et al. 2009, Tao et al. 2006). Jedoch gibt es unter allen beteiligten Genen eine nicht unerhebliche interindividuelle Variation hinsichtlich des Nichtanlagenmusters.

Einige der oben genannten Genmutationen jedoch bewirken nicht nur das Auftreten von Oligodontien, sondern sind auch mit anderen Fehlbildungen und/oder einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert. Chalothorn et al. (2008) beschreiben ein erhöhtes Risiko für epitheliale Ovarialkarzinome, Lammi et al. (2004) ein erhöhtes Risiko für kolorektale Karzinome. So ist bekannt, dass Störungen in der MSX1-Gen-Expression an der Entstehung von Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten beteiligt sind (Jumlongras et al. 2001). Patienten mit EDA-Mutationen können auch eine Beteiligung aller anderen ektodermalen Strukturen (zum Beispiel Haare, Haut, Nägel) zeigen (Mues et al. 2010).

Die bisher in der Literatur vorliegenden Publikationen zu non-syndromalen Oligodontien sind rein deskriptiven Charakters und verwenden keine einheitliche Definition der Oligodontie. Daher ist es für den Kliniker bisher weitgehend unmöglich, ein bestimmtes Oligodontie-Muster (Phänotyp) verdachtsweise mit einer bestimmten Genmutation (Genotyp) zu assoziieren. Dies wäre durchaus sinnvoll, da das Risiko besteht, dass Mutationen, die potentiell zu Krebserkrankungen bzw. Fehlbildungen führen, an zukünftige Generationen vererbt werden können.

1.3 Gliederung und Aufbau der Arbeit

Die folgende Arbeit gliedert sich in zwei Teile:

- | | |
|----------------------------------|---|
| I) Systematisches Review: | Genetischer Hintergrund non-syndromaler Oligodontien - ein systematisches Review mit Meta-Analyse |
| II) Klinische Studie: | Assoziation von Genotyp und Phänotyp bei non-syndromalen Oligodontien |

Beide Teile stellen eine für sich eigenständige Arbeit dar.

In Teil I soll der Inhalt der Publikation „Genetischer Hintergrund non-syndromaler Oligodontien - ein systematisches Review mit Meta-Analyse“ (Ruf et al. 2013, s. Publikationsverzeichnis, S.171), welche im Juli 2013 in der Fachzeitschrift „Fortschritte der Kieferorthopädie“ erschienen ist, vorgestellt werden. Hierbei umfasst der Eigenanteil an der Publikation die Datenaktualisierung und Ergänzung des von Klimas, Hönemann und Ruf 2009 begonnenen systematischen Reviews, die Aufarbeitung der Tabellen und Grafiken sowie die Mitarbeit an der Publikation. Die Aktualisierung beinhaltet den Zeitraum November 2010 bis Januar 2013, wobei eine Doppeluntersuchung des Zeitraumes März bis November 2010 erfolgte.

Die bestehende Datenlage in der Literatur, die durch das Systematische Review mit Metaanalyse aufgearbeitet wurde, lässt einen Zusammenhang zwischen Oligodontie-Phänotyp und Oligodontie-Genotyp vermuten. Hieraus ergab sich eine neue Fragestellung:

Wie zuverlässig ist die Anwendung der Ergebnisse der Genotyp-Phänotyp-Assoziation in einem unselektierten Oligodontie-Patientengut?

In Teil I werden zunächst die Ergebnisse und die Schlussfolgerung des systematischen Reviews und der Metaanalyse beschrieben; weiterhin wird die Stellung der Publikation in der Dissertation geschildert. Anschließend findet sich eine Ergänzung bedingt durch

die Datenaktualisierung, welche nach dem Erscheinungsdatum der Publikation durchgeführt wurde. Die veröffentlichte Publikation findet sich im Anhang (s.S.171).

In Teil II soll die Aussagekraft der in Teil I gefundenen Ergebnisse an einem unselektierten Patientengut untersucht werden.

Teil I

Inhaltsverzeichnis

Genetischer Hintergrund non-syndromaler Oligodontien – ein systematisches Review mit Meta-Analyse

I.1	Ergebnisse, Schlussfolgerung und Stellung der Publikation in der Dissertation	12
I.2	Detaillierte Erläuterung: Tooth Agenesis Code	14
I.3	WNT10A Mutationen: Inhaltlicher Zusammenhang der Ergänzungen	15
I.4	Ergänzung Material und Methode	17
I.5	Ergänzung Ergebnisse	18
I.6	Ergänzung Diskussion	20

I.1 Ergebnisse, Schlussfolgerung sowie Stellung der Publikation in der Dissertation

Die Publikation „Genetischer Hintergrund non-syndromaler Oligodontien – ein systematisches Review mit Meta-Analyse“ findet sich im Publikationsverzeichnis (Ruf et al. 2013, s. S. 171).

Die Untersuchungsergebnisse des systematischen Reviews zeigen, dass bis zum Zeitpunkt der Veröffentlichung im Jahr 2013 Mutationen in sieben Gene im Zusammenhang mit non-syndromalen Oligodontien beschrieben wurden. Es handelt sich hierbei um die Gene PAX9, MSX1, EDA, AXIN2, NEMO, KRT17 und EDARADD. Es wurde ebenso eine Mutation in einer möglichen PAX9-Promotorregion beschrieben, welche mit non-syndromalen Oligodontien assoziiert ist.

Das am häufigsten genannte Gen sowohl bei der Anzahl der beschriebenen Mutationen als auch bei der Anzahl der beschriebenen Patienten im systematischen Review war PAX9. Hier fanden sich 33 genannte Mutationen und 93 Patienten. Am zweithäufigsten wurden Mutationen im Gen MSX1 beschrieben (zwölf Mutationen), hierbei wurden 33 betroffene Patienten erwähnt. Das Gen EDA zeigte zehn Mutationen und 51 Patienten während für das Gen AXIN2 nur sechs Mutationen und 17 Patienten beschrieben wurden. Mutationen in den Genen EDARADD, NEMO und KRT17 fanden sich wesentlich seltener: Für diese Gene wurde jeweils nur ein Patient mit einer Mutation in der Literatur beschrieben. Auch die für die mögliche PAX9-Promotorregion beschriebene Patientenanzahl war mit sieben Patienten, die nur eine einzige Mutation zeigten äußerst selten.

Für 15,5% des Probandenguts (53 von 343 Patienten) konnte trotz genetischer Analyse keine Mutation detektiert werden. Die Ursache hierfür mag in der singulären Analyse von nur einzelnen Genen liegen.

Die Auswertung für die Metaanalyse ergab, dass 15 Arbeiten eingeschlossen werden konnten. Nicht inkludiert wurden die Gene NEMO, KRT17 und EDARADD, da für diese wie bereits erwähnt bis zum Zeitpunkt der Untersuchung jeweils nur ein Patient in der Literatur beschrieben worden war. Die Probanden mit Mutationen in der möglichen PAX9 Promotorregion wurden nicht weiter untersucht weil alle beschriebenen

Probanden zu einer Familie gehörten. Deshalb hätte man anhand dieser Ergebnisse keine Aussage über das Verhalten in einer anderen Population machen können.

Die 15 untersuchten sowie eingeschlossenen Arbeiten beschreiben 33 PAX9-, 14 MSX1-, 35 EDA- und zehn AXIN2-Patienten. Nur einer der Patienten wies einen nicht familiären Erbgang der Oligodontie auf und zeigte eine de-novo Mutation. Hierbei handelt es sich um eine AXIN2-Mutation welche in einer Studie von Lammi et al. 2004 beschrieben wurde.

Um die Auswertung der Ergebnisse verständlicher zu machen, wird an dieser Stelle auf die detaillierten Erläuterungen zum Tooth Agensis Code (s. Kapitel I.2) verwiesen. Durch Addition der TAC-Quadrantenmodalwerte aller vier Quadranten ergab sich die TAC-Summe. Hierbei war die Verteilung bestimmter TAC-Summen zwischen den vier analysierten Genen durchaus unterschiedlich: Trennwerteigenschaften für die empirisch ermittelte TAC-Summe von 250 wurden herausgearbeitet. Werte unterhalb von 250 zeigten sich bei 100% der MSX1 und bei 80% der EDA Patienten, während Werte oberhalb dieser Grenze bei 96,9% der PAX9- und bei 90% der AXIN2-Patienten gefunden werden konnten.

Bei Betrachtung der TAC-Quadrantenmodalwerte fiel auf, dass ein ungerader TAC-Wert in einem oder mehreren Quadranten bei 94,3% der EDA-Patienten, jedoch lediglich bei 28,6% der MSX1-Patienten vorkam. Der TAC-Wert 112 in einem oder mehreren Quadranten zeigte sich bei 72,7% der PAX9-, jedoch bei keinem der AXIN2-Patienten.

Abschließend kann festgehalten werden, dass durch Anwendung des Tooth Agensis Codes im Rahmen der Metaanalyse innerhalb des Probandenguts eine Assoziation zwischen Oligodontiephänotyp und -genotyp herausgearbeitet werden konnte. Ob diese Ergebnisse aber auf ein unselektiertes Patientengut übertragbar sind, war bis dato unklar.

Die Publikation nimmt also insofern einen sehr großen Stellenwert in der Dissertation ein, als dass neben dem Zugewinn an gefundenen Ergebnisse die Grundlage sowie die Fragestellung aus Teil II erst durch die Ergebnisse des systematischen Reviews sowie der Metaanalyse entstanden sind.

I.2 Detaillierte Erläuterungen: Tooth Agenesis Code

Ein neuer Ansatz, der „Tooth Agenesis Code“ (TAC), der den Vergleich zwischen Individuen und die Identifikation von bestimmten Nichtanlagemustern erleichtert, wurde 2006 von van Wijk und Tan präsentiert. Der TAC ist ein numerischer Code, der die Anzahl und die genaue Position nicht angelegter Zähne für jeden Quadranten beschreibt (Abb. I.2.1). Es wird zwischen TAC-Werten, welche sich auf den jeweiligen Quadranten beziehen und TAC-Summen (Addition der vier TAC Werte aus allen Quadranten) unterschieden. Die TAC-Werte pro Quadrant ergeben sich durch den Wert, der den jeweiligen fehlenden Zähnen zugeordnet ist; sie wurden von van Wijk und Tan beschrieben: Durch Addition der einzelnen Werte pro Quadrant ergibt sich der TAC-Quadrantenwert. Durch Addition der vier einzelnen Quadrantenwerte ergibt sich die TAC-Summe, welche in den obigen Ergebnissen und in der Publikation beschrieben wird; die Bedeutung der TAC-Summe wurde von den Autoren herausgestellt: Es gibt Häufungen von TAC-Werten, die auf die Mutation eines bestimmten Gens hinweisen können. Genauere Informationen zum TAC-Wert sind unter folgender Adresse einzusehen: <http://www.toothagenesiscode.com>, genauere Informationen bezüglich der Bedeutung der TAC-Summe finden sich in der Publikation (s. S. 171).

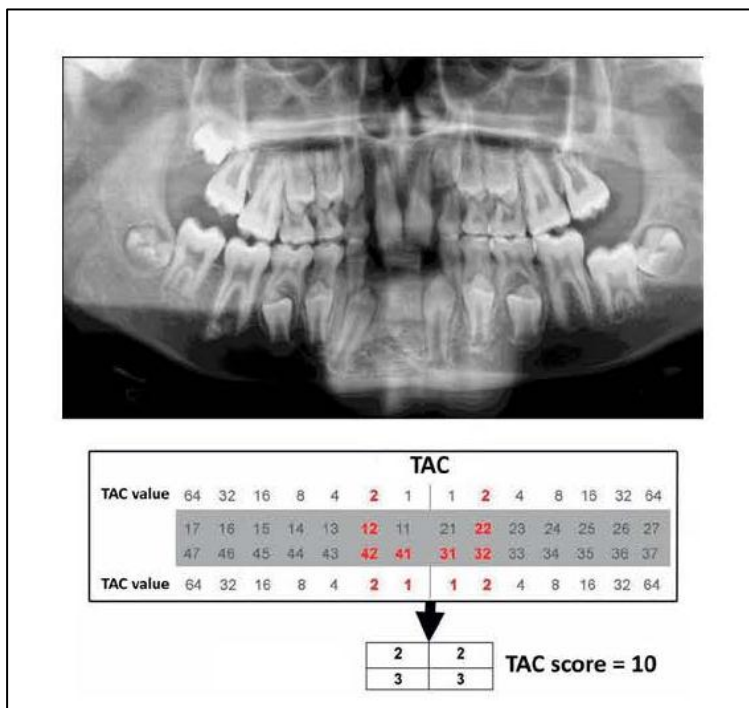


Abb. I.2.1: Jeder fehlende Zahn erhält einen numerischen Wert. Die Werte werden für jeden Quadranten addiert. Durch Addition der TAC Quadrantenwerte ergibt sich die TAC-Summe (van Wijk et al. 2006).

I.3 WNT10A Mutationen: Inhaltlicher Zusammenhang zu den folgenden Ergänzungen

Nach Akzeptanz des Artikels „Genetischer Hintergrund non-syndromaler Oligodontien – ein systematisches Review mit Meta-Analyse“ (Ruf et al. 2013) bzw. nach Ende des Inklusionszeitraumes für diese Publikation, sind in der Literatur neue Studien erschienen die zeigen, dass neben den im Artikel dargestellten Genen zusätzlich Mutationen in einem weiteren Gen für die Entstehung von Oligodontien verantwortlich zu sein scheinen: Es handelt sich hierbei um WNT10A.

Die Verbindung zwischen den für non-syndromale Oligodontien verantwortlichen Genen, die in der Metaanalyse untersucht wurden und dem Gen WNT10A während der Zahnentwicklung wird im Schaubild der kraniofazialen Signalwege deutlich (s. Abb. I.3.1).

Die veröffentlichten WNT10A-Artikel sollten nach dem gleichen Vorgehen wie in der Publikation analysiert werden (s. Publikation S. 171). Die jeweiligen Ergänzungen zu Material und Methode, zu den Ergebnissen sowie zur Diskussion finden sich direkt im Anschluss.

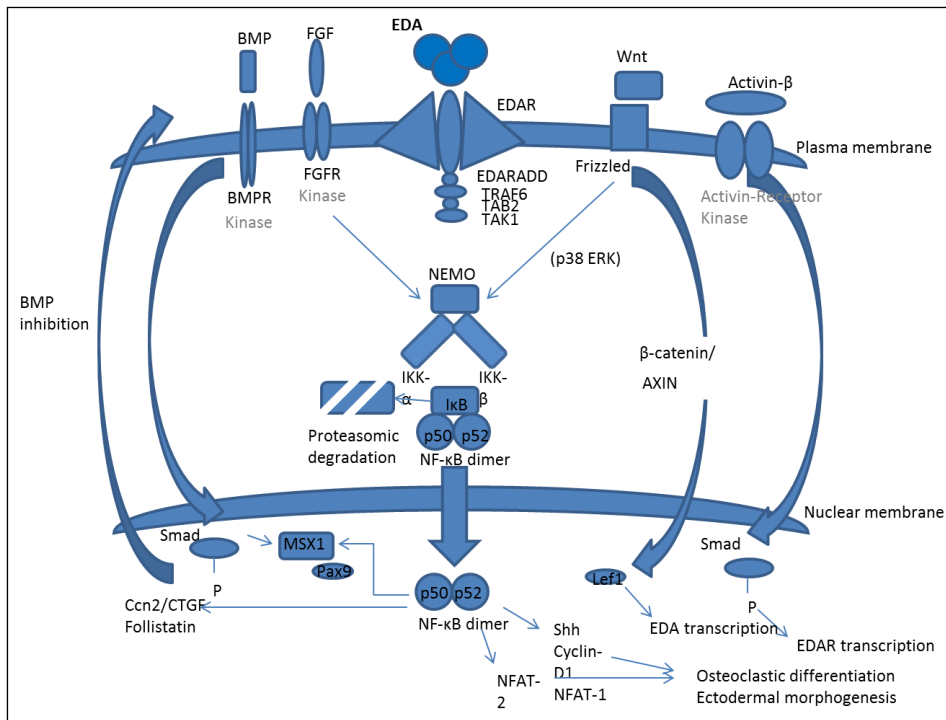


Abb. I.3.1: Interaktion kraniofazialer Signalwege.

I.4 Ergänzung Material und Methode

WNT10A-Mutationen

Um die entsprechenden Daten zu WNT10A mit den Daten der im Publikationsverzeichnis enthaltenen Publikation vergleichen zu können, wurden auf alle mittels einer einfachen elektronischen Literaturrecherche identifizierten Artikel zu WNT10A und Hypo- bzw. Oligodontien, die gleichen Einschluss- bzw. Ausschlusskriterien, die für das systematische Review sowie für die Metaanalyse geltend waren, angewendet.

I.5 Ergänzung Ergebnisse

Den Ein- bzw. Ausschlusskriterien entsprachen auf Ebene des „Systematic Reviews“ zwei WNT10A Artikel: Mostowska et al. (2013) und van den Boogaard et al. (2012). Die beiden Arbeiten beschreiben zehn verschiedene WNT10A-Mutationen, betroffen waren insgesamt 39 oligodonte Patienten. Keine bisher publizierte WNT10A-Studie erfüllte die Einschlusskriterien der „Metaanalyse“. Die Genanalysen zeigten in der Studie von van den Boogaard et al. (2012) bei 56 % aller Patienten mit nicht-syndromalen Nichtanlagen (teils hypodont, teils oligodont) WNT10A-Mutationen. Mostowska et al. (2013) führten bei 42 Patienten mit non-syndromalen Nichtanlagen (auch hier teils hypodont, teils oligodont) Genanalysen für die Gene MSX1, PAX9 und WNT10A durch. Bei 15 Patienten wurde keine Mutation gefunden, bei lediglich einem Patienten eine Mutation des Gens PAX9 und bei 26 (62%) Patienten konnte eine Mutation im WNT10A-Gen gefunden werden.

Tab.I.5.1: Im systematischen Review nach Datenaktualisierung bis einschließlich 01/2013 identifizierte Gene inklusive Angabe der Anzahl der Mutationen und der Anzahl der Patienten mit Mutationen in dem jeweiligen Gen.

Identifizierte Gene	Anzahl der Mutationen	Anzahl der Patienten	Referenzen (Ziffern: s. Lit.verzeichnis der Publikation)
PAX9 (Paired-box-gene)	36	95	[1, 6, 12, 13, 16, 23, 25, 26, 30, 34, 38, 42, 44, 45, 49, 54, 64, 65, 67, 78, 80, 82, 83, 85], Boeira Junior 2013 et al., van den Boogaard et al. (2012), Zhu et al. (2012), Mostowska et al. (2013)
MSX1 (Muscle segment homeobox 1)	13	34	[6, 11, 14, 29, 39, 46, 53, 75, 81], van den Boogaard et al. (2012)
EDA (Ectodysplasia-A)	10	51	[5, 22, 37, 47, 48, 56, 63, 68, 69]
AXIN2 (Axis inhibition protein)	6	17	[6, 35, 40]
WNT10A (Wingless 10A)	11	39	van den Boogaard et al. (2012), Mostowska et al. (2013)
putative PAX9 Promotor	1	7	[42]
EDARADD (Ectodysplasin-A receptor-associated adapter protein)	1	1	[6]
NEMO (NF-kappa-B essential modulator)	1	1	[32]
KRT17 (Keratin type I cytoskeletal 17)	1	1	[19]

I.5 Ergänzung Diskussion

Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse von van den Boogaard et al. (2012), Bergendal et al. (2011) und den von uns gefundenen, in Teil I beschriebenen Ergebnissen zeigt, dass in dem Artikel von Bergendal et al. (2011) bei 89% der nicht familiären Oligodontiepatienten keine Genmutation identifiziert wurde, wohingegen van den Boogaard et al. (2012) in 29% der Fälle keine Mutationen finden konnten und in den vorliegenden Ergebnissen nur in 15,5% aller in der Literatur beschriebenen Fälle kein genetischer Hintergrund dargestellt werden konnte. Ein wichtiger Hinweis sei hierbei, dass in den aus Teil I vorliegenden Ergebnissen per Zufall fast ausschließlich familiäre Oligodontien untersucht wurden, Bergendal et al. (2011) hingegen arbeiteten mit einem Probandengut, welches zum größten Teil nicht familiär war. Gleiches gilt für die Studie von van den Boogaard et al. (2012): 13 der 58 Teilnehmer waren miteinander verwandt, dies entspricht nur 22% des Probandenguts, welches familiär war.

Stellt man diese Ergebnisse von van den Boogaard et al. (2012) und von Mostowska et al. (2013) mit denen der Studie von Bergendal et al. (2011), in welcher die Gene AXIN2, EDA, EDAR, EDARADD, MSX1 und PAX9 analysiert wurden gegenüber, so könnte der Grund dafür, dass nur bei 11% der Patienten mit Oligodontien Mutationen gefunden wurden, folgende Ursachen haben:

1. Es wurden zu einem großen Teil nicht-familiäre Fälle untersucht.
2. Das Gen WNT10A wurde nicht analysiert.

Vermerkt werden muss zum einen, dass Bergendal et al. (2011) Oligodontien untersucht haben, während sowohl van den Boogaard et al. (2012) als auch Mostowska et al. (2013) hypo- und oligodonte Patienten in ihre Studie inkludiert hatten. Weiterhin sollte berücksichtigt werden, dass es sich bei den Artikeln von Bergendal et al. (2011), van den Boogaard et al. (2012) und Mostowska et al. (2013) um Studien handelt, wohingegen es sich bei den vorliegenden Ergebnisse um ein Review handelt. Dieses analysiert schon allein aufgrund eines nicht auszuschließenden Publikationsbias möglicherweise eine für die Grundgesamtheit nicht repräsentative Stichprobe.

Zusammenhang der Teile I und II in der Dissertation

Da das Patientengut des systematischen Reviews und der Metaanalyse eindeutig selektiert war und Mutationen über mehrere Generationen aufwies, sowie extrem schwere Oligodontien mit meist oligodonter familiärer Genese zeigte, war unklar, ob die gefundenen Ergebnisse auch auf ein unselektiertes Oligodontiepatientengut anwendbar sind. Der Nutzen der Studie im Klinikalltag, insbesondere für die Identifikation von Risikopatienten, sollte untersucht werden.

Um die Fragestellung zu beantworten, ob die Ergebnisse auf die klinische Situation übertragbar sind und ob die Identifizierung von Patienten mit bestimmten Mutationen anhand ihres Nichtanlagemusters möglich ist, wurden alle zwischen Januar 1986 und April 2013 aufgenommenen, non-syndromalen Oligodontiepatienten der Poliklinik für Kieferorthopädie der Justus-Liebig-Universität Gießen kontaktiert. Ziel war es, ein möglichst großes unselektiertes Patientengut zu erhalten um an diesem die Anwendbarkeit der gefundenen Ergebnisse zu überprüfen.

Das weitere Vorgehen hierfür ist in Teil II beschrieben.

Abschließend sollte festgehalten werden, dass die Idee für Teil II erst aus den Untersuchungsergebnissen des Systematischen Reviews und der Metaanalyse entstanden ist.

Teil II

Inhaltsverzeichnis

Assoziation von Genotyp und Phänotyp bei non-syndromalen Oligodontien

II.1	Spezielle Einleitung	24
II.2	Ziel der Arbeit.....	25
II.3	Material und Methode	26
II.3.1	Allgemeiner Ablauf	26
II.3.2	Erhalt des genetischen Materials	27
II.3.3	DNA-Amplifizierung und Sequenzierung	29
II.3.4	Statistische Methoden	31
II.4	Ergebnisse	32
II.4.1	Genotyphypothese	35
II.4.2	Beschreibung der einzelnen Patienten/Familien/Genmutationen	39
II.4.2.1	Verdachtsdiagnose MSX1-Mutation	40
II.4.2.2	Verdachtsdiagnose EDA-Mutation.....	58
II.4.2.3	Verdachtsdiagnose AXIN2-Mutation.....	67
II.5	Diskussion.....	68

II.1 Spezielle Einleitung

Eine Erklärung der Oligodontiegenese für alle Patientenfälle war bisher in der Literatur trotz der identifizierten Kandidatengene bzw. Mutationen nicht möglich. Daher stellte sich die Frage, inwiefern die in der Literatur beschriebenen Fälle/Familien repräsentativ für die Grundgemeinschaft sind bzw. inwiefern sich der in Teil I beschriebene Zusammenhang zwischen Oligodontie-Genotyp und -Phänotyp auch in einem unselektierten Oligodontiepatientengut darstellen lässt. Da es sich um ein nicht-selektiertes Patientengut für die Population von Oligodontiepatienten handelte, können die hieraus gewonnenen Rückschlüsse als repräsentativ angesehen werden.

Der Nutzen, einen Patienten anhand seines Phänotyps screenen zu können, betrifft sowohl den Patienten selbst, als auch seine Familie. Könnte ein solches Screeningverfahren verifiziert und in der zahnärztlichen Praxis etabliert werden, so könnten selektierte Genanalysen erfolgen. Dies wäre finanziell, medizinisch, prophylaktisch, aber auch zeitlich vorteilhaft: Das Bewusstsein über potentiell erhöhte Risiken, an Krebs zu erkranken, Nachkommen mit Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten beziehungsweise Formen davon oder mit der Gefahr einer versteckten EDA-Mutation zu zeugen ist hilfreich, um Prävention, frühzeitige Prophylaxe und Aufklärung zu betreiben. Außerdem könnte es sinnvoll sein, Patienten mit unterschiedlichen Genotypen einer abweichenden kieferorthopädischen Behandlung zuzuführen. Da z.B. bekannt ist, dass AXIN2 auch die Osteoklastendifferenzierung hemmt (Bodine et al. 2006, Yan et al. 2009), während PAX9 dies nicht tut, wäre ein Lückenschluss in letzterem Fall vielleicht sinnvoll, während er im ersten Fall vielleicht gar nicht möglich ist. Entsprechende Studien fehlen in der Literatur bisher völlig. Von zahnärztlicher Seite könnte ggfs. anhand des Nichtanlagenmusters eine Empfehlung zur spezifischen Genuntersuchung gegeben werden.

II.2 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Studie war es zu verifizieren, ob sich der in Teil I geäußerte Verdacht einer Assoziation von Genotyp und Phänotyp bei non-syndromalen Oligodontien in einem unselektierten Oligodontiepatientengut bestätigen lässt. Konkret sollte analysiert werden, ob eine TAC basierte Prognose des Genotyps möglich ist. Die Validierung eines repräsentativen Patientenguts war möglich, da es sich bei dieser Studie im Vergleich zu den Studien der Metaanalyse um ein nicht selektiertes Patientengut handelte.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigt (11/2012) und finanziell durch den Wissenschaftsfond der Deutschen Gesellschaft für Kieferorthopädie unterstützt.

II.3 Material und Methode

II.3.1 Allgemeiner Ablauf

Alle seit 1986 in der Poliklinik für Kieferorthopädie des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen behandelten Patienten, bei welchen eine non-syndromale Oligodontie vorlag, wurden folgendermaßen ermittelt: Die Patientenakten von Januar 1986 bis April 2013 wurden durchgesehen, alle anamnestisch non-syndromalen Oligodontiepatienten wurden notiert. Als Einschlusskriterien für die Patienten galten das Vorliegen einer nicht-syndromalen Oligodontie, die Nichtanlagen mussten durch Orthopantomogramm (OPG) oder FDI-Zahnschema verifizierbar sein und es musste mindestens ein weiterer hypo- oder oligodonte Fall in der Familie vorliegen. Anschließend wurde versucht alle identifizierten Oligodontiepatienten telefonisch zu kontaktieren. Die non-syndromalen Oligodontiepatienten wurden mündlich über das Studienvorhaben aufgeklärt und bezüglich ihrer Familienanamnese befragt. Patienten, bei denen sich eine hypo- oder oligodonte Heredität anamnestisch nachweisen ließ, wurden um das Einholen der Erlaubnis zur Kontaktaufnahme zu Ihren Familienmitgliedern gebeten. Nachfolgend wurden alle Familienmitglieder, von denen die Erlaubnis zur Kontaktaufnahme und ebenso Kontaktdaten vorhanden waren, bezüglich vorliegender Hypo- oder Oligodontien befragt und über das Studienvorhaben informiert. Bei Einwilligung der Patienten respektive der Probanden fand zunächst eine detaillierte Aufklärung mit mindestens 24-stündiger Bedenkzeit und anschließender Einverständniserklärung statt. Ein Termin zur Abgabe einer Speichelprobe wurde vereinbart.

Auf der Grundlage der anamnestischen Daten wurde ein Familienstammbaum angelegt, welcher die Familienzugehörigkeit der Patienten und der verwandten Probanden sowie Informationen zum Ausprägungsgrad der Hypo- bzw. Oligodontie enthält.

Zur Auswertung und zum Vergleich der genspezifischen Phänotypen der zuvor rekrutierten Probanden wurden nach Erhebung des Zahnstatus gemäß FDI-Zahnschema die Nichtanlagedaten der eingeschlossenen oligodonten Probanden mit Hilfe des Tooth Agenesis Code (TAC) (van Wijk et al. 2006) ausgewertet. (s.

Abb.I.2.1). Danach wurde auf der Grundlage der in Teil I beschriebenen Häufungen spezieller TAC-Werte eine Genotypprognose gestellt (gemäß Abb.4, S.177).

II.3.2 Erhalt des genetischen Materials

Speichelproben der Patienten/Probanden dienten der Gendiagnostik. Dazu wurden 2 ml Speichel unter Aufsicht im dafür vorgesehenen Oragene DNA (og 500) Kit (DNAgenotek, Kanata, Ontario, Canada) gesammelt. Der pseudonymisierte Patientennamen, das Geburtsdatum sowie das Entnahmedatum wurden auf dem Oragene DNA (og 500) Kit notiert. Die Probanden wurden angewiesen, eine Stunde vor der Probenentnahme die Zähne gründlich zu reinigen und auf Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme bis zum Zeitpunkt der Abgabe der Speichelprobe zu verzichten. Das Verschließen des Oragene DNA Kits wurde durch den Prüfarzt durchgeführt. Bei dem Transport der Probe wurde auf eine adäquate Lagerung zwischen 15°C und 25°C geachtet. Die Proben wurden umgehend in die Poliklinik für Kieferorthopädie der Justus-Liebig-Universität gebracht und im Labor, in dem die Aufbereitung des genetischen Materials stattfinden sollte, aufbewahrt.

Datenmanagement

Alle während der Studie gesammelten Informationen wurden auf einem für diese Studie erstellten Erfassungsbogen dokumentiert. Der Versuchsleiter stellte sicher, dass die Erfassungsbögen komplett und richtig ausgefüllt wurden. Erklärten sich die Patienten sowie ihre Angehörigen bereit an der Studie teilzunehmen, so wurden für die Analyse folgende Daten erfasst:

1. Persönliche Daten

- Patienten-/Probandennummer
- Geburtsdatum
- Geschlecht
- Verwandtschaftsgrad der betroffenen Familienmitglieder (sofern verfügbar)

2. Studiendaten

- Muster der nicht angelegten Zähne des Patienten und der betroffenen Familienmitglieder (sofern verfügbar) sowie die entsprechenden TAC-Werte
- ggfs. Mutationen des Verdachtsdiagnosegens

Kontrollgruppe

Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit korrespondierenden Einträgen der NCBI GenBank und von Ensembl (www.ensembl.org) verglichen.

II.3.3 DNA-Amplifizierung und Sequenzierung

Die DNA-Amplifizierung wurde im Labor durch spezifisch geschultes Fachpersonal der Poliklinik für Kieferorthopädie der Justus-Liebig-Universität durchgeführt. Die DNA wurde nach Anweisung des Herstellers isoliert und gereinigt. Anschließend wurde die DNA amplifiziert und sequenziert.

Als Ziel der Analyse sollten Mutationen auf den Genen MSX1, EDA und AXIN2 evaluiert werden. PAX 9 wurde nicht analysiert, da keiner der vorliegenden Patienten eine PAX9-Verdachtsdiagnose aufwies.

Es wurde zunächst das Material des Patienten, der in der Poliklinik für Kieferorthopädie der Justus-Liebig Universität Gießen behandelt wurde, untersucht. Bei positivem Untersuchungsergebnis des genetischen Materials des Patienten wurden auch die verfügbaren Familienmitglieder genetisch untersucht. Bei vorliegender Genmutation des Patienten wurden sowohl oligodonte, hypodonte als auch Familienmitglieder ohne Nichtanlagen auf Mutationen in den entsprechenden Genen untersucht, um Geno- und Phänotypvariationen feststellen zu können.

Die Proben der Patienten bzw. Probanden wurden entsprechend der Verdachtsdiagnose auf Mutationen der Gene EDA, AXIN2 und MSX1 untersucht. Es wurden für EDA und MSX1 jeweils alle Exone analysiert, für AXIN2 erfolgte die Analyse für Exon 8 und 9. Es wurden lediglich die Exon begrenzenden Bereiche mituntersucht, dies bedeutet, dass nicht konkret Intronbereiche oder nicht-kodierende Bereiche untersucht wurden, sondern dass diese zusätzlichen Bereiche gegebenenfalls nur die Exone begrenzen und daher mit analysiert wurden. Für die einzelnen Gene wurden untersucht:

MSX1: Exon 1
 Exon 2

EDA: Exon 1-8

AXIN2: Exon 8
 Exon 9

Die Gene AXIN2 und MSX1 wurden in der Poliklinik für Kieferorthopädie der Justus-Liebig-Universität Gießen analysiert. Aus den Speichelproben wurde DNA mittels preplT-L2P der Firma DNAgenotek purifiziert. Die hierbei gewonnene DNA wurde mit TE Buffer der Firma Invitrogen verdünnt. Die Konzentration der Verdünnung betrug 30 ng DNA pro μl . Diese Verdünnung wurde bei 4° Celsius in einem Kühlschrank gelagert. Im Folgenden wurde die DNA mittels einem KIT Qiagen Hot Star HiFidelity Polymerase Kit der Firma Qiagen amplifiziert, dies erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurden Primer der Firma Sigma Aldrich für MSX1 und AXIN2 verwendet. Die Primersequenzen sind dem Anhang zu entnehmen. Die Amplifizierung erfolgte mit dem Gerät C1000 Thermal Cycler der Firma Bio-Rad. Anschließend wurden Funktion und Reinheit der amplifizierten DNA überprüft: Es wurde ein Agarosegel mit einer Kontrolle in Form eines Basenpaarmarkers angefertigt, dies geschah mittels Elektrophorese. Hierfür wurden 10 μl des PCR-Produktes (insgesamt 50 μl) verwendet. War die Funktion des erhaltenen PCR-Produktes gegeben, wurden diesem PCR-Produkt (insgesamt 40 μl nach Anfertigung des Agarosegels) 0,5 μl EXO-SAP-IT in einem Reaktionsgefäß der Firma Eppendorf zugesetzt und in dem Gerät C1000 Thermal Cycler der Firma Bio-Rad gereinigt. Die beiden Zyklen dauerten jeweils 15 Minuten - im ersten Zyklus wurde bei 37° Celsius inkubiert, der zweite Zyklus hatte eine Temperatur von 80° Celsius, dies diente der Inaktivierung. Abschließend war das Produkt gereinigt. Die übrigen 40 μl wurden zur Sequenzierung an die Firma SeqLab in Göttingen weitergeleitet. Diese wurde im September 2013 aufgekauft und in Microsynth, Göttingen, umbenannt.

Die Analyse des Gens EDA wurde extern durchgeführt. Hierzu wurde die Firma Microsynth (Zürich, Schweiz) beauftragt. Die Arbeitsschritte Isolierung und Purifizierung der DNA wurden in dem Labor der Poliklinik für Kieferorthopädie der Justus-Liebig-Universität durchgeführt. Die folgenden Schritte inklusive der Amplifizierung sowie Sequenzierung wurden durch die Firma Microsynth ausgeführt.

Die genauen PCR-Ansätze für die jeweiligen Gene sind den Anhängen zu entnehmen.

II.3.4 Statistische Methoden

Da bei dieser Studie die Überprüfung einer klinisch gestellten Hypothese für jeden einzelnen Patienten vorgesehen war, bei der jeweils lediglich eine stimmt/stimmt nicht-Entscheidung gefällt werden konnte, wurde keine statistische Auswertung durchgeführt.

II.4 Ergebnisse

Nach Durchsicht der Patientenakten der Poliklinik für Kieferorthopädie der Justus-Liebig-Universität Gießen von Januar 1986 bis April 2013 fanden sich 46 Oligodontiepatienten. Neun Patienten wurden ausgeschlossen, da sie verschiedene Formen syndromaler Oligodontien bzw. verschiedene Ausprägungsgrade von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten zeigten. Es fanden sich 37 Patienten, die potentiell in die Studie aufgenommen werden konnten (Abb. II.4.1a).

Bei fünf Patienten war der Kontakt nicht herstellbar. Zwei Patienten nahmen nach dem ersten Telefonkontakt kein weiteres Telefonat der Prüfer mehr an. Eine der Familien mit zwei oligodonten Patienten, die beide abgeschlossen behandelt waren, lehnte die Teilnahme ebenso ab wie ein weiterer Patient. Sieben Patienten zeigten familienanamnestisch keine weiteren Nichtanlagen.

Somit ergaben sich 20 Patienten, die Interesse an einer Studienteilnahme hatten und die Einschlusskriterien erfüllten. Da es sich bei zwei Probanden um Brüder handelt, wurden insgesamt 19 verschiedene Familien in die Studie inkludiert (Abb. II.4.1b).

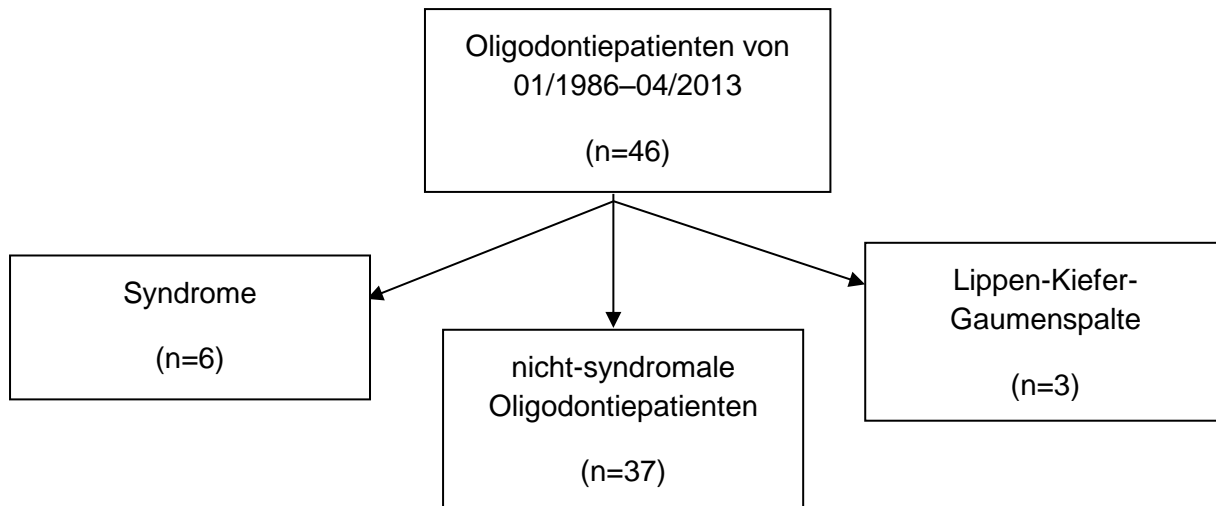


Abb. II.4.1a: Flussdiagramm der Patientenidentifizierung und –rekrutierung.

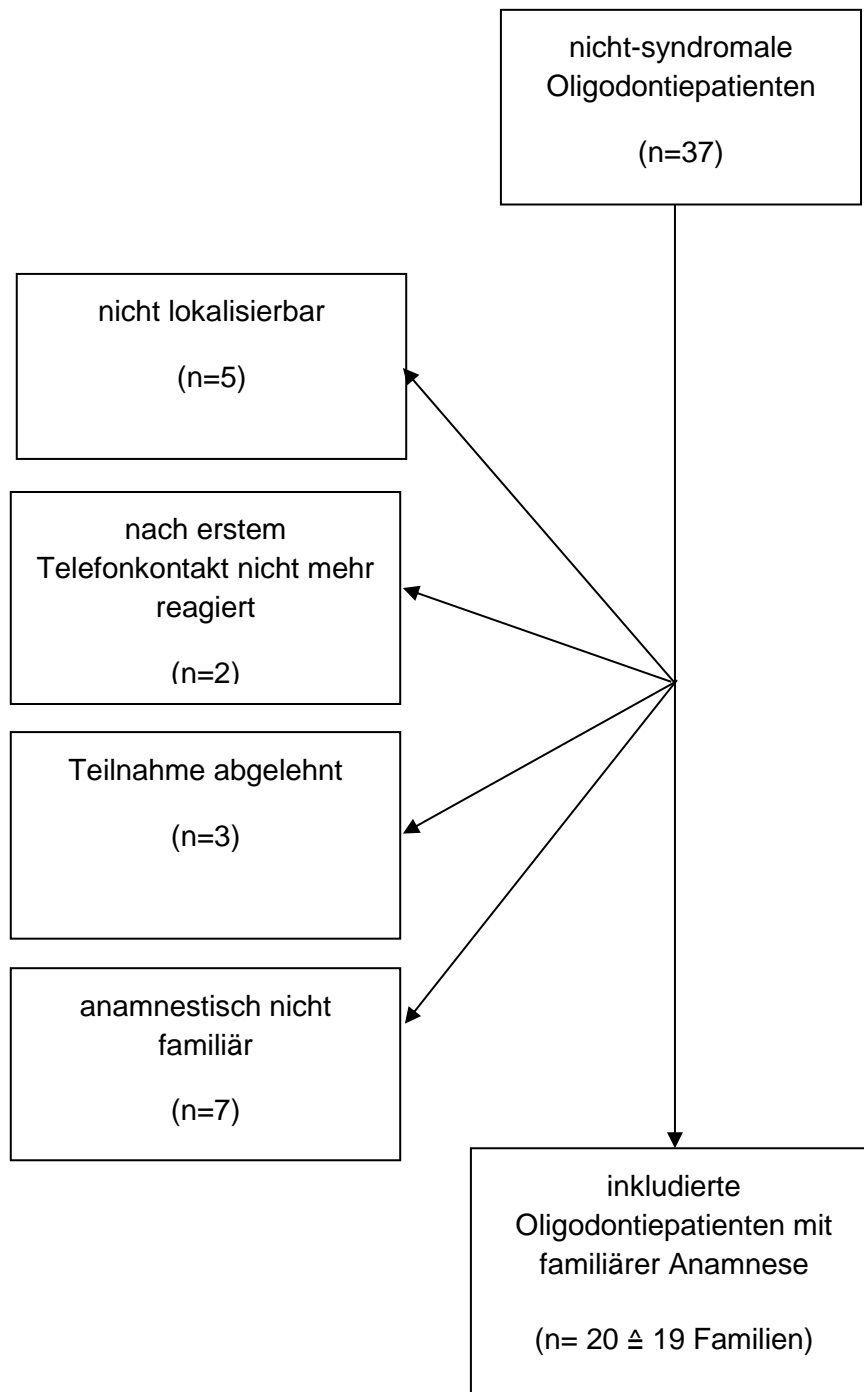


Abb. II.4.1b: Flussdiagramm der Patientenidentifizierung und –rekrutierung.

II.4.1 Genotyphypothese

Die 20 rekrutierten sowie in die Studie inkludierten Patienten lassen auf der Grundlage ihrer TAC-Codes bzw. ihrer TAC-Summe (siehe Abb.I.2.1) eine Mutationsvermutung zu (Abb.4 und Abb.5, S.177). Es handelte sich um elf Patienten mit MSX1-Verdacht, um drei Patienten mit AXIN2-Verdacht und um sechs Patienten mit EDA-Verdacht (Tab. II.4.1). Keiner der non-syndromalen oligodonten Patienten der Poliklinik für Kieferorthopädie der Justus-Liebig-Universität Gießen zeigte die Verdachtsdiagnose PAX9.

Die Familien wurden entsprechend ihrer Verdachtsdiagnose benannt und fortlaufend nummeriert. Beispielsweise beschreibt der Code V-AXIN2-1 eine Familie mit dem Verdacht („V“) auf Mutation im Gen AXIN2; es handelt sich hierbei um die erste Familie („1“) (Tabelle II.4.4). Die Familien mit der Verdachtsdiagnose MSX1 finden sich in Tabelle II.4.2, Familien mit der Verdachtsdiagnose EDA in Tabelle II.4.3.

Tab. II.4.1: Laufende Probandennummern mit TAC-Code und TAC-Summe sowie daraus resultierender Mutationshypothese.

laufende Nummer	TAC-Code	TAC-Summe	Mutations- hypothese
1	24.24.24.16	88	MSX 1
2	18.26.16.88	148	MSX 1
3	110.78.55.109	352	AXIN 2
4	18.18.8.16	60	MSX 1
5	34.34.3.3	74	EDA
6	18.18.1.17	54	EDA
7	94.78.71.71	314	AXIN 2
8	24.24.16.16	80	MSX 1
9	2.2.3.3	10	EDA
10	2.2.19.19	42	EDA
11	24.24.24.24	96	MSX 1
12	14.14.19.19	66	EDA
13	16.26.16.16	74	MSX 1
14	82.18.80.80	260	AXIN 2
15	8.10.80.80	178	MSX 1
16	24.26.80.84	214	MSX 1
17	34.34.32.32	132	MSX 1
18	2.2.17.17	38	EDA
19	26.26.80.16	148	MSX1
20	22.16.16.16	70	MSX1

TAC: Tooth Agenesis Code

Tab. II.4.2: Familien mit Verdachtsdiagnose MSX1-Mutation

oligodonte Patienten	Verdachts- diagnose	Familie	Familien- code	Familienmitglieder		
				oligodont	hypodont	normal
1	MSX1	I	V-MSX1-1	0	1	4
2	MSX1	II	V-MSX1-2	0	2	3
4	MSX1	III	V-MSX1-3	0	2	3
8	MSX1	IV	V-MSX1-4	0	1	3
11	MSX1	V	V-MSX1-5	0	3	1
13	MSX1	VI	V-MSX1-6	0	2	1
15	MSX1	VII	V-MSX1-7	0	3	8
16	MSX1	VIII	V-MSX1-8	0	1°	5
17	MSX1	IX	V-MSX1-9	0	2	2
18	MSX1	X	V-MSX1-10	0	1	2
19	MSX1	XI	V-MSX1-11	0	1	2

*keine Teilnahme, da Proband im Ausland lebt

°keine Teilnahme, da Proband nicht kontaktierbar

Tab. II.4.3: Familien mit Verdachtsdiagnose EDA-Mutation

oligodonte Patienten	Verdachts- diagnose	Familie	Familien- code	Familienmitglieder		
				oligodont	hypodont	normal
5	EDA	I	V-EDA-1	0	1	9
6	EDA	II	V-EDA-2	0	1	3
9; 12	EDA	III	V-EDA-3	0	1	5
10	EDA	IV	V-EDA-4	0	3	1
18	EDA	V	V-EDA-5	0	3	4

Tab. II.4.4: Familien mit Verdachtsdiagnose AXIN2-Mutation

oligodonte Patienten	Verdachts- diagnose	Familie	Familien- code	Familienmitglieder		
				oligodont	hypodont	normal
3	AXIN2	I	V-AXIN2-1	1°	0	3
7	AXIN2	II	V-AXIN2-2	0	1*	3
14	AXIN2	III	V-AXIN2-3	0	3	2

*keine Teilnahme, da Proband im Ausland lebt

°keine Teilnahme, da Proband nicht kontaktierbar

II.4.2 Beschreibung der Patienten/Familien/Genmutationen

Im Folgenden werden nur die Familien beschrieben, bei welchen Genmutationen gefunden wurden. Familienstammbäume, Orthopantomogramme, Fotos und FDI-Schemata (sofern verfügbar) sowie Familienbeschreibungen aller anderen Familien finden sich im Anhang. Um das Lesen der Stammbäume zu erleichtern ohne zu häufige Wiederholungen der Stammbaumlegenden einzubringen, wird diese sowohl hier als auch auf der letzten Seite dieser Arbeit zu finden sein.

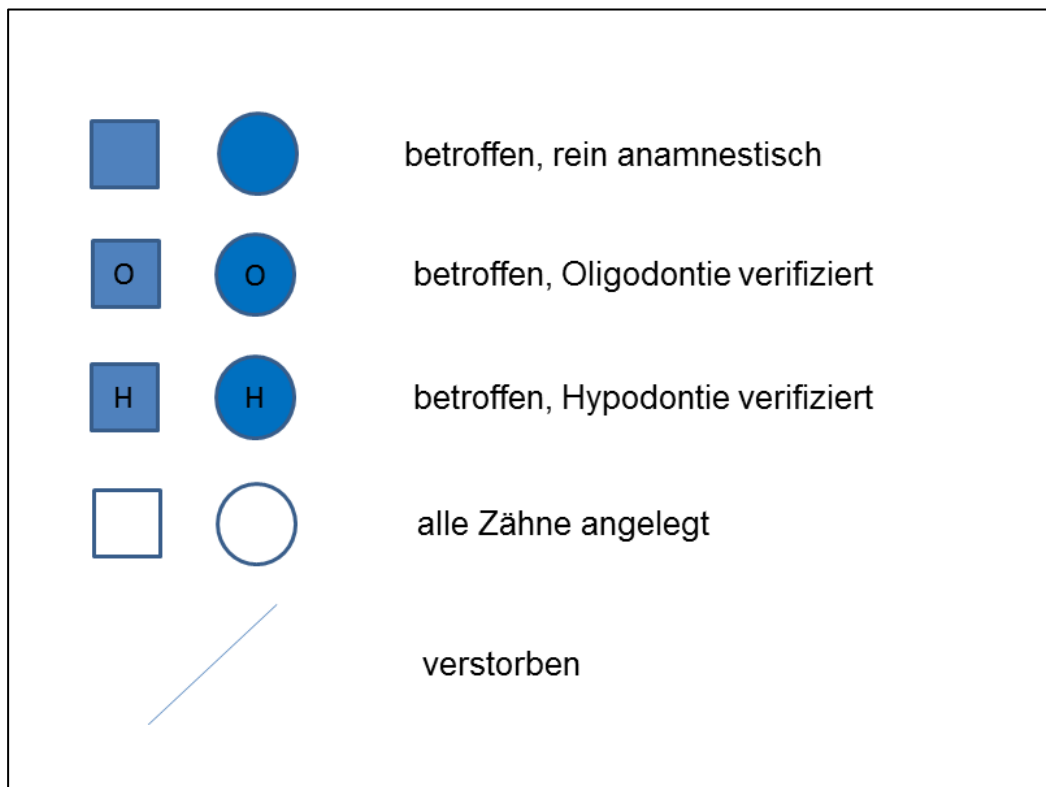


Abb. II.4.2: Legende Familienstammbaum

II.4.2.1 Verdachtsdiagnose MSX1-Mutation

Im Probandengut fanden sich elf Familien mit Verdacht auf MSX1-Mutation (Familie V-MSX1-1 bis Familie V-MSX1-11). Nach Ruf et al. (2013) liegen die TAC-Summen der in der Literatur beschriebenen MSX1-Fälle in 100% der Fälle bei ≤ 250 ; weiterhin finden sich nur bei 28,6% dieser Patienten ungerade TAC-Werte in mindestens einem Quadranten, wohingegen dies bei 94,3% der Patienten mit EDA-Mutation der Fall ist (s. Abb.5, S.177). Ausschließlich gerade TAC-Werte mit TAC-Summen ≤ 250 lassen daher eine MSX1-Mutation vermuten.

Bei der Untersuchung des Gens MSX1 wurde eine 3'UTR Variante auf Exon 2 gefunden. Weiterhin wurde eine heterozygote Missense-Variante der Aminosäuresequenz an der Position 40 des Exon 1 gefunden. Beide führen zu keiner funktionellen Mutation und sind daher nicht als pathologisch einzustufen.

Die Analyse der Speichelproben ergab im Rahmen der PCR sowie der Gensequenzierung, dass bei dem Probanden III:1 der Familie V-MSX1-6 und bei der Probandin II:2 der Familie V-MSX1-10 ein Single Nucleotid Polymorphismus (SNP) in Form einer 3'UTR Variante im Exon 2 des MSX1 Gens zu finden ist, welche bei 19% der Bevölkerung vorhanden ist und nicht pathologisch ist (www.ensembl.org). Es handelt sich um eine Substitution von T zu C an der Stelle 864876. Diese Region ist nicht-kodierend, stellt aber eine 3'UTR Variante einer Regulatorregion dar. Eine UTR-Variante (Abkürzung für „untranslated region“) beschreibt die Mutation in einem untranslatierten Bereich. Diese befinden sich nicht nur auf der mRNA, sondern auch auf der DNA, kodieren aber nicht für Proteine. Vor und hinter diesen untranslatierten Bereichen (5'UTR, 3'UTR) finden sich jeweils vor der 5'UTR die 5'-Kappe am Anfang der mRNA und der Poly-A-Schwanz am Ende der mRNA, also hinter der 3'UTR. Der 3'-UTR-Bereich folgt der kodierenden Region der mRNA; der Anfang liegt hinter dem Stoppcodon, das Ende vor dem Polyadenylierungsstartpunkt. Im 3'-UTR Bereich liegen Protein regulierende Sequenzen: Es gibt Bindestellen für Proteine und für mRNA. Die gebundenen Proteine regulieren sowohl die Stabilität als auch den Transport der mRNA. Weiterhin kann eine Polyadenylierungssignalsequenz vorliegen. Diese führt ggfs. dazu, dass das Transkript abgebrochen wird. (Löffler et al. 2014, http://de.wikipedia.org/wiki/Untranslatierter_Bereich).

Die 3'UTR-Variante auf Exon 2 wurde bei zwei der untersuchten Probanden gefunden, beide zeigen zusätzlich die Missense-Variante der Aminosäuresequenz an Position 40 des Exons 1:

Bei dem Probanden III:1 der Familie V-MSX1-6 wurde die erwähnte 3'UTR-Variante festgestellt. Neben dieser wurde zusätzlich die oben bereits genannte Missense-Variante gefunden. Die Missense-Variante befindet sich an der Aminosäureposition 40 in Exon 1. Es handelt sich um die Familie V-MSX1-6 (Details siehe Patientenbeschreibung).

Diese 3'UTR-Variante des Exons 2 sowie die Missense-Variante auf Exon 1 wurde ebenfalls bei der Probandin II:2 der Familie V-MSX-10 gefunden (Details siehe Patientenbeschreibung).

Weiterhin wurde bei zwei weiteren Probanden die Missense-Variante der Aminosäure an der Position 40 im Exon 1 des MSX1-Gens gefunden, ohne dass parallel die 3'UTR-Variante auf Exon 2 vorhanden war. Hierbei handelt es sich um Probanden der Familien V-MSX1 und V-MSX-2. Diese beiden Familien werden aufgrund der isolierten Missense-Variante erst im Anschluss an die Familien V-MSX-6 und V-MSX-10 beschrieben.

Durch die Substitution der Base Guanin anstelle von Cytosin an der Basenposition 4861745 des MSX1-Gens kommt es zu einer Veränderung der Aminosäure: Durch diese Genvariante findet sich an der Aminosäureposition 40 Glycin statt Alanin (s. Abb. II.4.4). Diese Missense-Variante findet sich bei 13% der Gesamtpopulation und ist nicht pathologisch (www.ensembl.org).

Zusammenfassend sind beide beschriebenen Genvarianten des MSX1-Gens nicht pathologisch (www.ensembl.org).

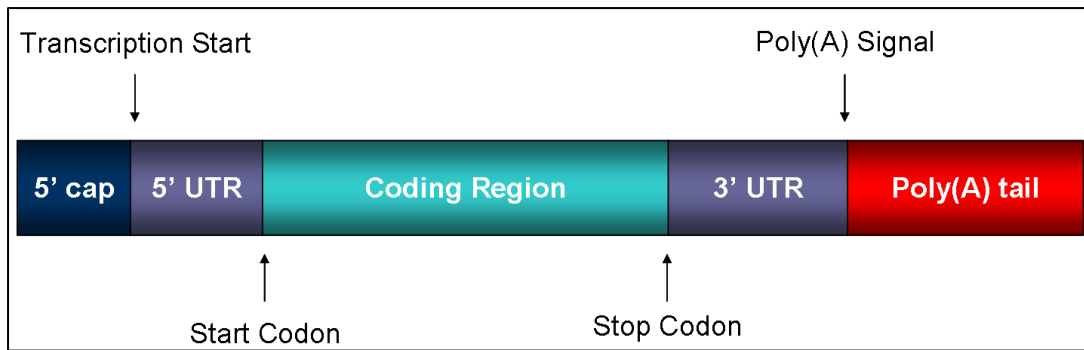


Abb. II.4.3: Schema mRNA mit 5'-Kappe, 5'UTR, 3'UTR sowie Poly-A-Schwanz (http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/d/d3/Mature_mRNA.png).

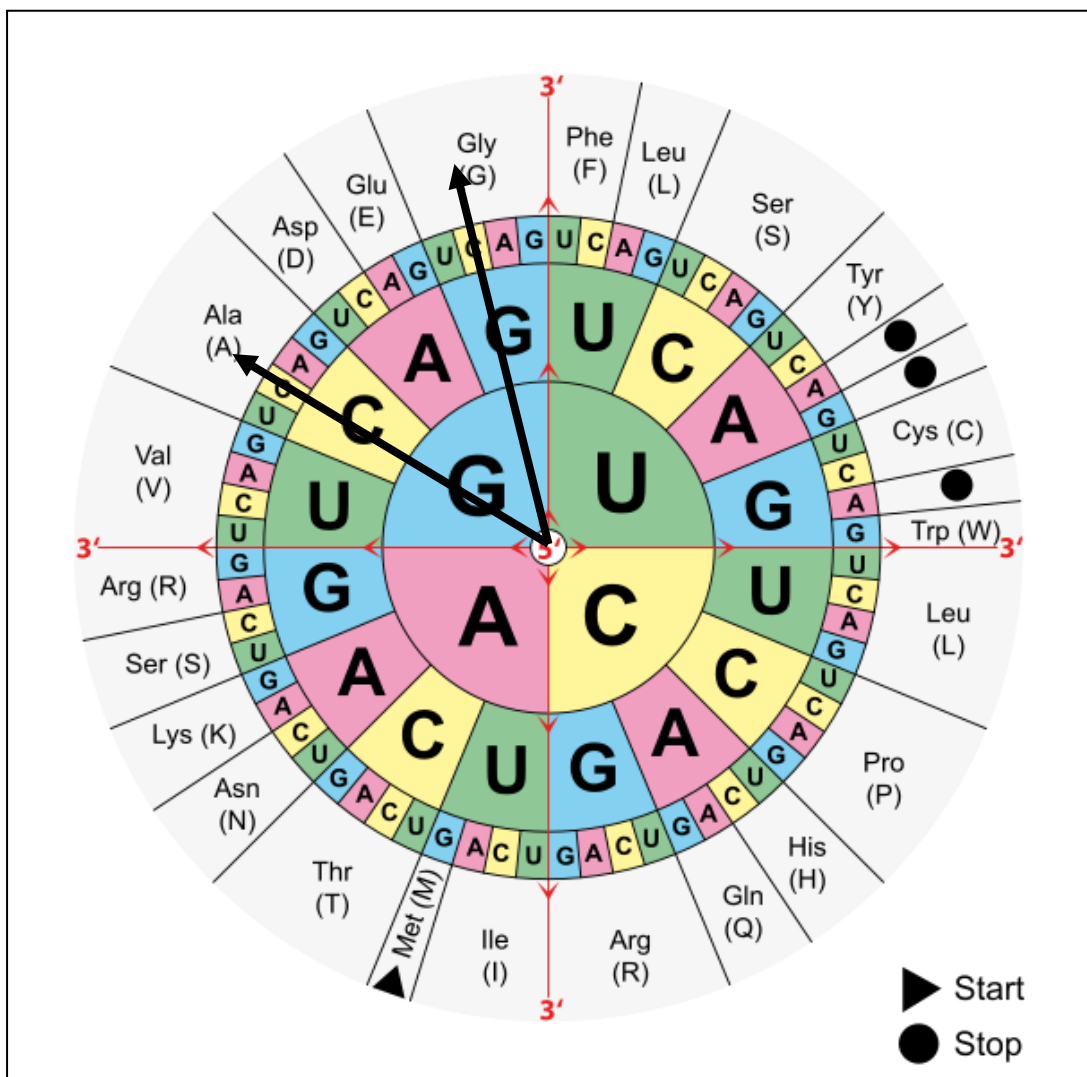


Abb. II.4.4: Aminosäuresonne mit dargestellter Veränderung der Aminosäure durch Transposition der Base (<http://de.wikipedia.org/wiki/Code-Sonne>).

Familie V-MSX1-6

Ein Sohn der Familie V-MSX1-6 wurde behandelt (Abb. II.4.5). Der Proband III:1 zeigte anamnestisch sechs Nichtanlagen mit einer TAC-Summe von 74 (TAC Quadrantenwerte 16, 26, 16, 16). Die Mutter (II:1) und die Großmutter (I:2) haben ebenfalls Nichtanlagen. Bei dem Vater des Probanden (II:2) und bei dem Bruder der Mutter (II:3) sind alle Zähne angelegt. Der Familienstammbaum ist in Abbildung II.4.7 dargestellt.

An der Studie nahmen die Probanden I:1, II:1, II:2 sowie III:1 teil. Die Analyse der Speichelproben ergab im Rahmen der PCR sowie der Gensequenzierung, dass bei dem Probanden III:1 ein Single Nucleotid Polymorphismus (SNP) im Exon 2 des MSX1 Gens zu finden ist. Es handelt sich um eine Substitution von T zu C an der Stelle 864876. Dieser Single Nucleotid Polymorphismus hat keine funktionellen Folgen: Gemäß der Datenbank Ensembl befindet sich dieser in einer nicht-codierenden Region. Weiterhin ist hier einzusehen, dass 19,1% der gesamten Population diese Genvariante tragen (www.ensembl.org). Eine Missense-Variante stellt sich in Exon 1 des MSX1 Gens dar. Die Graphiken mit den Ergebnissen der Genanalyse finden sich in Abbildung II.4.6.



7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC	Summe
														16	26
														16	16

PROBAND III:1



Abb. II.4.5: Familie V-MSX1-6. Proband III:1 im Alter von 19 Jahren. Enface-Bild, Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

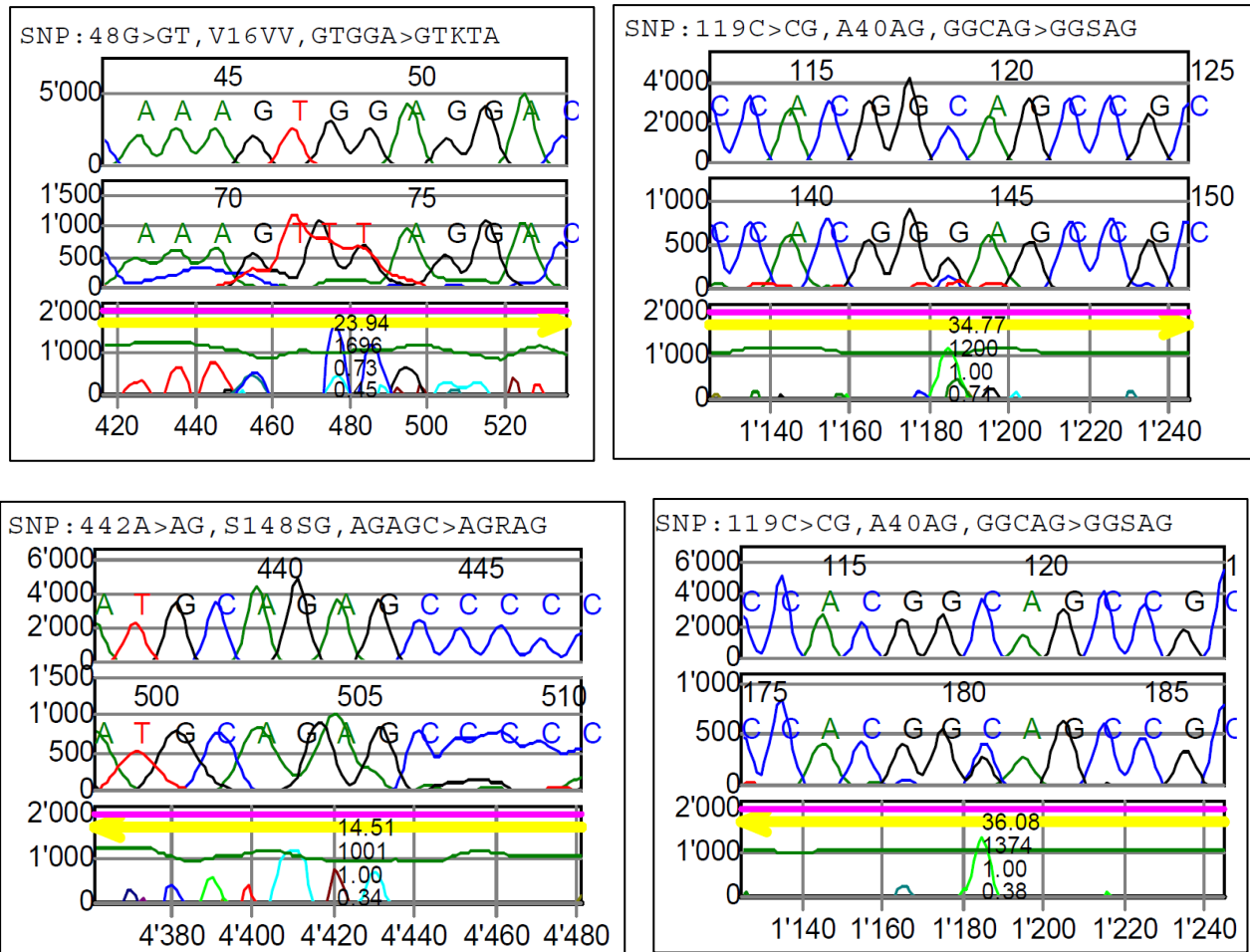


Abb. II.4.6: Ergebnisse des Probanden III:1 der Familie V-MSX1-6. Die beiden oberen Graphiken zeigen die Ergebnisse bei Verwendung des Forward-Primers, die beiden unteren Graphiken stellen die Ergebnisse nach Verwendung des Reverse-Primers dar.

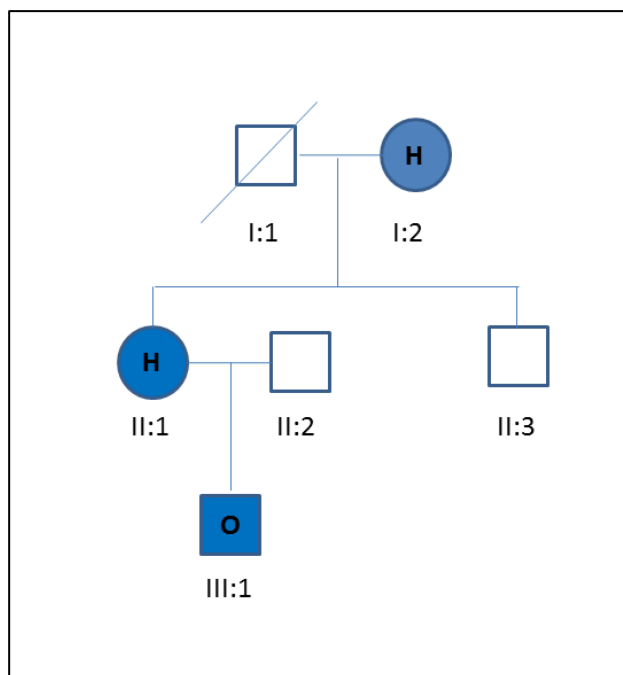


Abb. II.4.7: Familienstammbaum der Familie V-MSX1-6.

Familie V-MSX1-10

Eine Tochter der Familie V-MSX1-10 wurde behandelt (Abb. II.4.8). Die Probandin II:2 zeigte anamnestisch sechs Nichtanlagen mit einer TAC-Summe von 148 (TAC Quadrantenwerte 26, 26, 80, 16). Bei dem Bruder (II:1) sind ebenfalls Nichtanlagen vorhanden. Der Vater (I:2) und die Mutter (I:1) haben eine normale Dentition. Der Familienstammbaum ist in Abb. II.4.10 dargestellt.

Die Probandin II:2 zeigte ebenso wie der Proband II:1 der Familie V-MSX1-6 sowohl die 3'UTR-Variante auf Exon 2 sowie die Missense-Variante auf Exon 1 des MSX1 Gens. Die Graphiken mit den Ergebnissen der Genanalyse der Probandin II:2 finden sich in Abb. II.4.9.

An der Studie nahmen die Probanden I:2 und II:2 teil.



7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC		Summe
			X	X		X		X		X	X			26	26	=148
X		X										X		80	16	
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7			

PROBAND II:2



Abb. II.4.8: Familie V-MSX1-10. Proband II:2 im Alter von 18 Jahren. Enface-Bild, Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

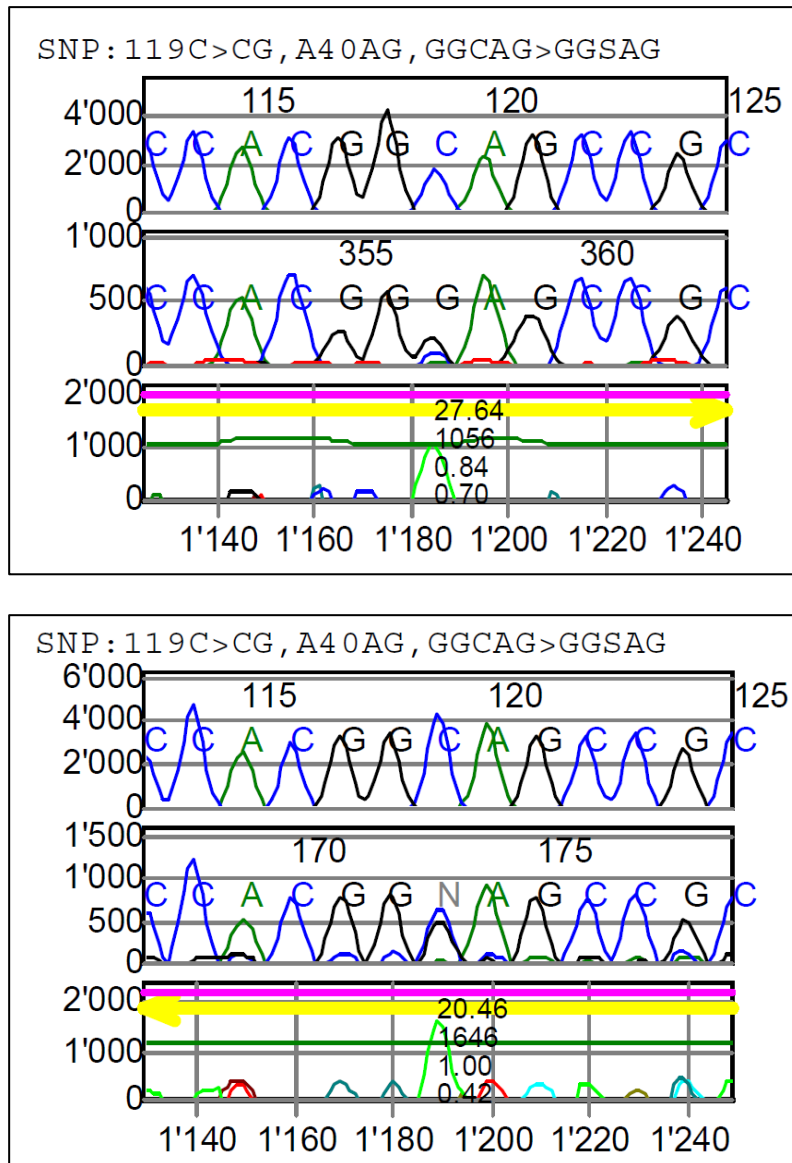


Abb. II.4.9: Ergebnisse des Probanden II:2 der Familie V-MSX1-10 (SNP). Die obere Graphik zeigt die Ergebnisse bei Verwendung des Forward-Primers, die untere Graphik stellt die Ergebnisse nach Verwendung des Reverse-Primers dar. Durch Substitution der Base Cytosin zu Guanin kommt es zur Bildung der Aminosäure Glycin anstelle von Alanin an der Aminosäureposition 40 (Ala40Gly).

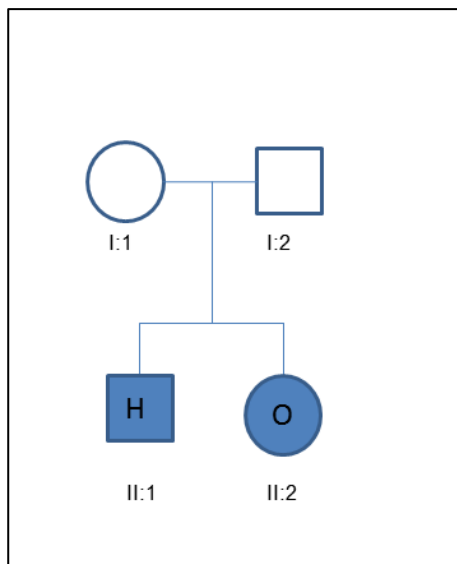


Abb II.4.10: Familienstammbaum der Familie V-MSX1-10.

Familie V-MSX1-1

Die Probandin III:2 der Familie V-MSX1-1 wurde behandelt (Abb. II.4.11). Die Probandin III:2 zeigte anamnestisch sieben Nichtanlagen mit einer TAC-Summe von 88 (TAC Quadrantenwerte 24, 24, 24, 16). Bei der Mutter (II:2) sind ebenso Zähne nicht angelegt. Der Bruder der Probandin (III:1), die Cousins (III:3, III:4) wie auch der Vater (II:1), die Tante (II:3) und der Onkel (II:4) zeigen keine Nichtanlagen. Die Großeltern sind verstorben; beide zeigten anamnestisch keine Nichtanlagen. Der Familienstammbaum ist in Abb. II.4.13 dargestellt. Die Graphiken mit den Ergebnissen der Genanalyse der Probandin III:2 finden sich in Abb. II.4.12.

An der Studie nahmen die Probanden II:1, II:2, II:3, III:2, III:3 und III:4 teil.



7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC		Summe
		X	X							X	X			24	24	
		X	X								X			24	16	
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7			



Abb. II.4.11: Familie V-MSX1-1. Proband III:1 im Alter von 20 Jahren. Enface-Bild, Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

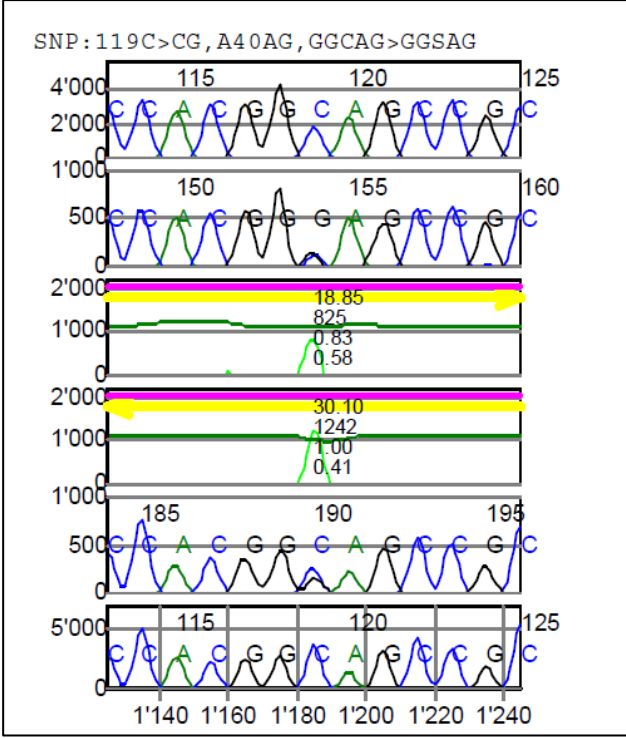


Abb. II.4.12: Ergebnisse des Probanden III:2 (SNP im Exon 1) der Familie V-MSX1-1. Die obere Graphik zeigt die Ergebnisse bei Verwendung des Forward-Primers, die untere Graphik stellt die Ergebnisse nach Verwendung des Reverse-Primers dar. Durch Substitution der Base Cytosin durch Guanin kommt es zur Bildung der Aminosäure Glycin anstelle von Alanin an der Aminosäureposition 40 (Ala40Gly).

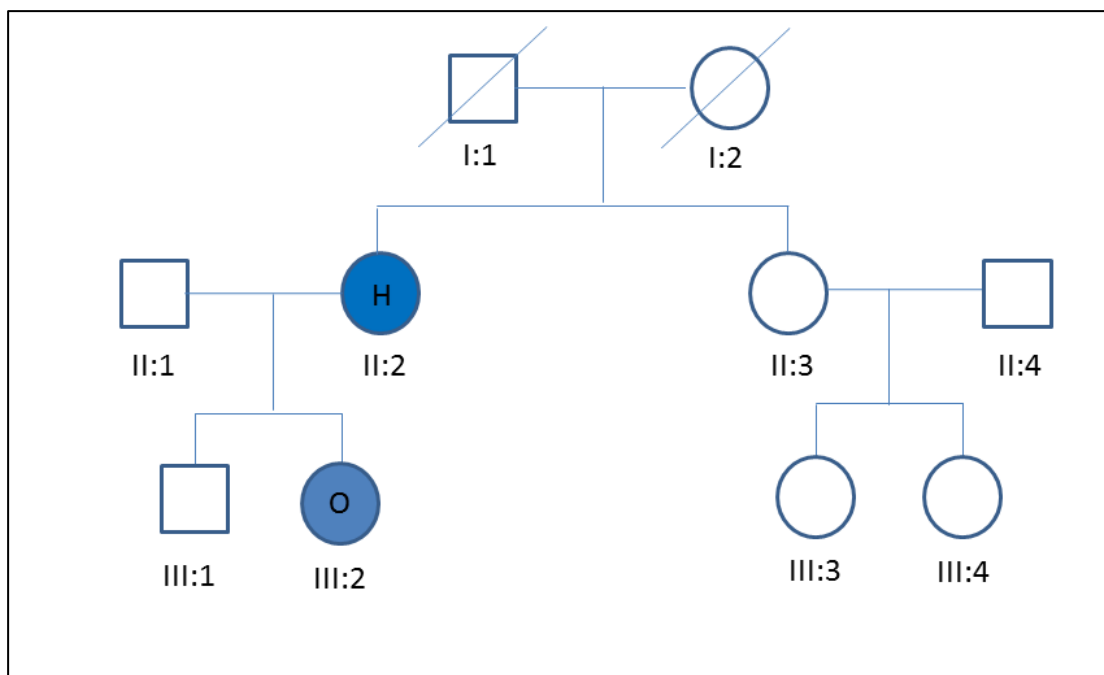


Abb. II.4.13: Familienstammbaum der Familie V-MSX1-1.

Familie V-MSX1-2

Eine Tochter der Familie V-MSX1-2 wurde behandelt (Abb. II.4.14). Die Probandin III:1 zeigte anamnestisch neun Nichtanlagen mit einer TAC-Summe von 148 (TAC Quadrantenwerte 18, 26, 16, 88). Bei der Tante (II:5) und der Schwester (III:2) sind ebenso Zähne nicht angelegt. Die Eltern der Probandin (II:1, II:2) und der Bruder des Vaters (II:3) zeigen keine Nichtanlagen. Die Großeltern (I:1, I:2) sind verstorben, anamnestisch sind aber keine Nichtanlagen bekannt. Der Familienstammbaum ist in Abb. II.4.16 dargestellt. Die Graphiken mit den Ergebnissen der Genanalyse der Probandin II:2 finden sich in Abb. II.4.15.

An der Studie nahmen die Probanden II:1, II:2, II:3, II:4, III:1 und III:2 teil.



7 6 5 4 3 2 1							1	2	3	4	5	6	7	TAC		Summe
														18	26	=148
														16	88	



Abb. II.4.14: Familie V-MSX1-2. Proband III:1 im Alter von 10 (Enface-Bild) bzw. 12 Jahren (Orthopantomogramm), FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

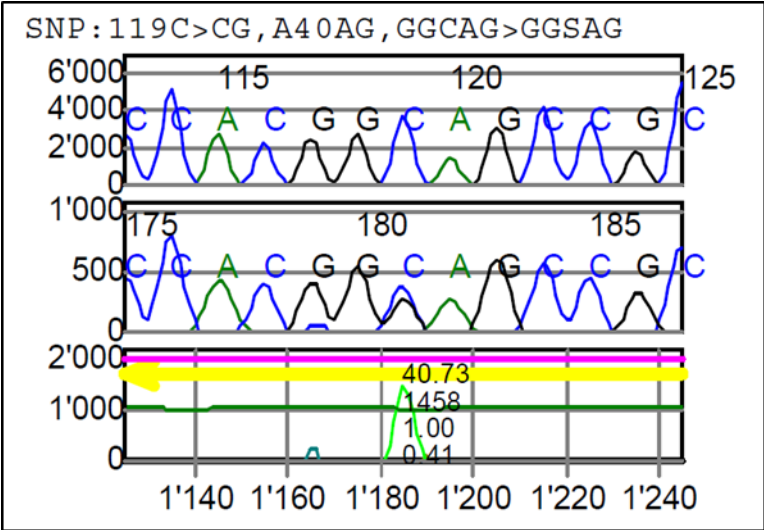


Abb. II.4.15: Familie V-MSX1-2. Proband III:1. SNP im Exon 1. Durch Substitution der Base Cytosin durch Guanin kommt es zur Bildung der Aminosäure Glycin anstelle von Alanin an der Aminosäureposition 40 (Ala40Gly).

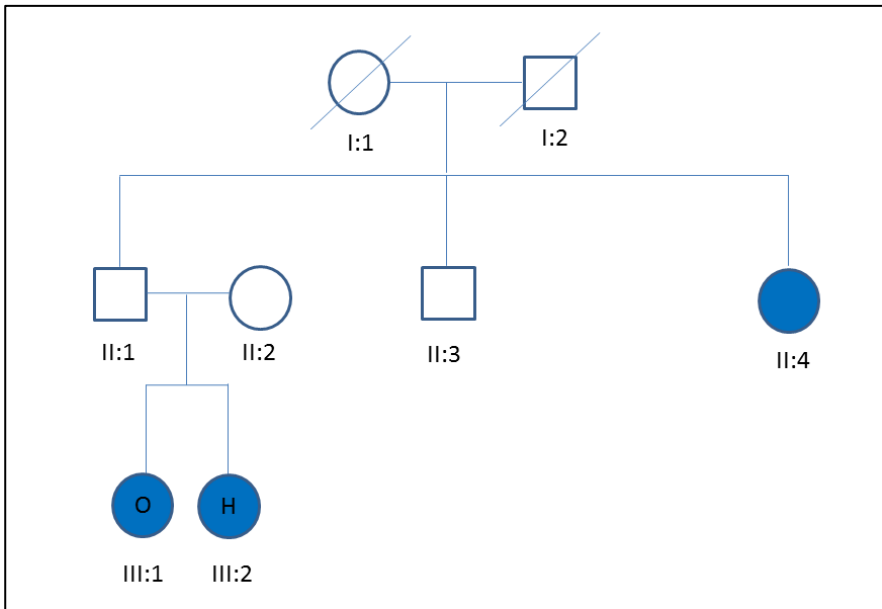


Abb. II.4.16: Familienstammbaum der Familie V-MSX1-2.

II.4.2.2 Verdachtsdiagnose EDA-Mutation

Im Probandengut fanden sich fünf Familien mit Verdacht auf EDA-Mutation (Familie V-EDA-1 bis Familie V-EDA-5). Nach Ruf et al. (2013) liegen die TAC-Summen in 80% der Fälle bei ≤ 250 ; weiterhin finden sich bei 94,3% dieser Patienten ungerade TAC-Werte in mindestens einem Quadranten (s. Abb. 5, S.177). Im Rahmen der genetischen Untersuchung wurde eine neue Punktmutation gefunden. Die zwei in der Poliklinik für Kieferorthopädie der Justus-Liebig-Universität Gießen behandelten Patienten der Familie V-EDA-3 zeigten Genmutationen in Exon 7 des EDA-Gens, welche auch bei Familienmitgliedern gefunden wurden. In Zusammenarbeit mit dem biochemischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen wurde eine funktionelle Proteinanalyse durchgeführt. Die Kollaboration mit Dr. Wolfgang Wende zeigte folgende Ergebnisse: Die Gensequenzierung ergab eine EDA-Missensemutation welche an der Stelle c.866 eine Substitution von G>A aufweist. Diese resultiert in der Bildung von Histidin (CAC) anstelle von Arginin (CGC) an der Aminosäureposition p.289, welche auf dem Bereich der TNF Domäne liegt. Das EDA-Monomer Diagramm zeigt, dass diese Aminosäureposition auf einer Beta-Haarnadelstruktur lokalisiert ist und aus der Proteinhülle heraus kommt. (Abb. II.4.24). Die Oberflächendarstellung des EDA-Trimers verdeutlicht, dass Histidin an der Position p.H289 vermutlich mit Protein-Protein-Kontakten interferieren kann.

Die Mutationsanalyse für EDA zeigt bei den Probanden II:2; II:4; III:4 und III:5 eine Heterogenität an der Position c.866 G=G/G>A, während bei den Probanden II:3 und III:3 keine Mutation gefunden werden konnte. Dies spricht für ein maternales Vererbungsmuster der EDA Mutation.

Familie V-EDA-3

Zwei Söhne der Familie V-EDA-3 wurden behandelt (Abb. II.4.18, Abb. II.4.19); beide waren oligodont und hatten Zeichen von Hautabnormalitäten (hypopigmentierte Haut) und dünnem Haar (Hypotrichose). Der Proband III:1 zeigte anamnestisch sechs Nichtanlagen mit einer TAC-Summe von 10 (TAC Quadrantenwerte 2, 2, 3, 3) während bei seinem jüngeren Bruder (III:2) zwölf Zähne kongenital fehlten. Bei diesem Probanden fiel zusätzlich eine atypische Ohrform auf. Die TAC-Summe dieses Probanden betrug 66 (TAC Quadrantenwerte 14, 14, 19 und 19).

Nach Aufstellung eines Familienstammbaumes zeigte sich, dass die Mutter (II:2) der beiden in der Abteilung behandelten Söhne mit einem zweiten Partner (II:3) einen weiteren Sohn (III:3) sowie eine Tochter (III:4) (Zahnschema der Probandin III:4: s. Abb. II.4.21) hat. Die Tochter zeigt im Alter von acht Jahren schon eine Hypodontie, bei dem Sohn (III:3) sind im Alter von neun Jahren noch keine Nichtanlagen aufgefallen. Weiterhin berichtet die Mutter (II:2), dass der Großvater (I:1) der Kinder (ihr Vater) oligodont war, jedoch sind sowohl der Großvater als auch die Großmutter (I:2) bereits verstorben. Aus dieser Ehe ist eine weitere Tochter (II:4) hervorgegangen (neben der Mutter der beiden Patienten) (OPG s. Abb. II.4.22), welche ebenfalls keine Nichtanlagen aufweist. Sie hat zwei Töchter im Alter von 20 Monaten (III:6) und von zwölf Jahren (III:5), bei der älteren Tochter (III:5) sind keine Nichtanlagen vorhanden, bei der jüngeren Tochter lässt sich aufgrund des Alters noch kein Zahnstatus bestimmen. Der Familienstammbaum ist in Abb. II.4.23 dargestellt. Die Graphiken mit den Ergebnissen der Genanalyse der Probanden III:1 und III:2 finden sich in Abb. II.4.20.

An der Studie nahmen die Probanden II:2, II:3, II:4, III:1, III:2, III:3, III:4 sowie III:5 teil. Die Analyse des genetischen Materials der Familie V-EDA-3 wies Mutationen auf: Die Probanden 9 und 12 zeigten Genmutationen in Exon 7 des EDA-Gens. An der Aminosäureposition 289 wird durch Substitution der zweiten Base eines Codons an der Basenposition 866 (CGC zu CAC) ein ursprüngliches Arginin zu einem Histidin (Abb. II.4.17). Anschließend wurde das genetische Material der weiteren Familienmitglieder (V-EDA-3) ebenfalls analysiert. Auch hier fanden sich Genmutationen. Untersucht wurden die Familienmitglieder II:2, II:3, II:4, III:3, III:4 und III:5. Genmutationen wurden bei den Probanden II:3, II:4, III:4, III:5 festgestellt. Der Partner (II:3) der Probandin II:2 sowie der aus dieser Beziehung hervorgegangen Sohn III:3 zeigen als einzige der

getesteten Familienmitglieder keine Mutation. Als wichtig hervorzuheben ist, dass es sich um eine x-chromosomale Vererbung handelt. Die männlichen Probanden sind homozygot, während die weiblichen Probanden heterozygot, also lediglich Träger sind und je ein Allel mit der Mutation und eines mit der normalen Basensequenz sowie der daraus resultierenden Aminosäuresequenz zeigen.

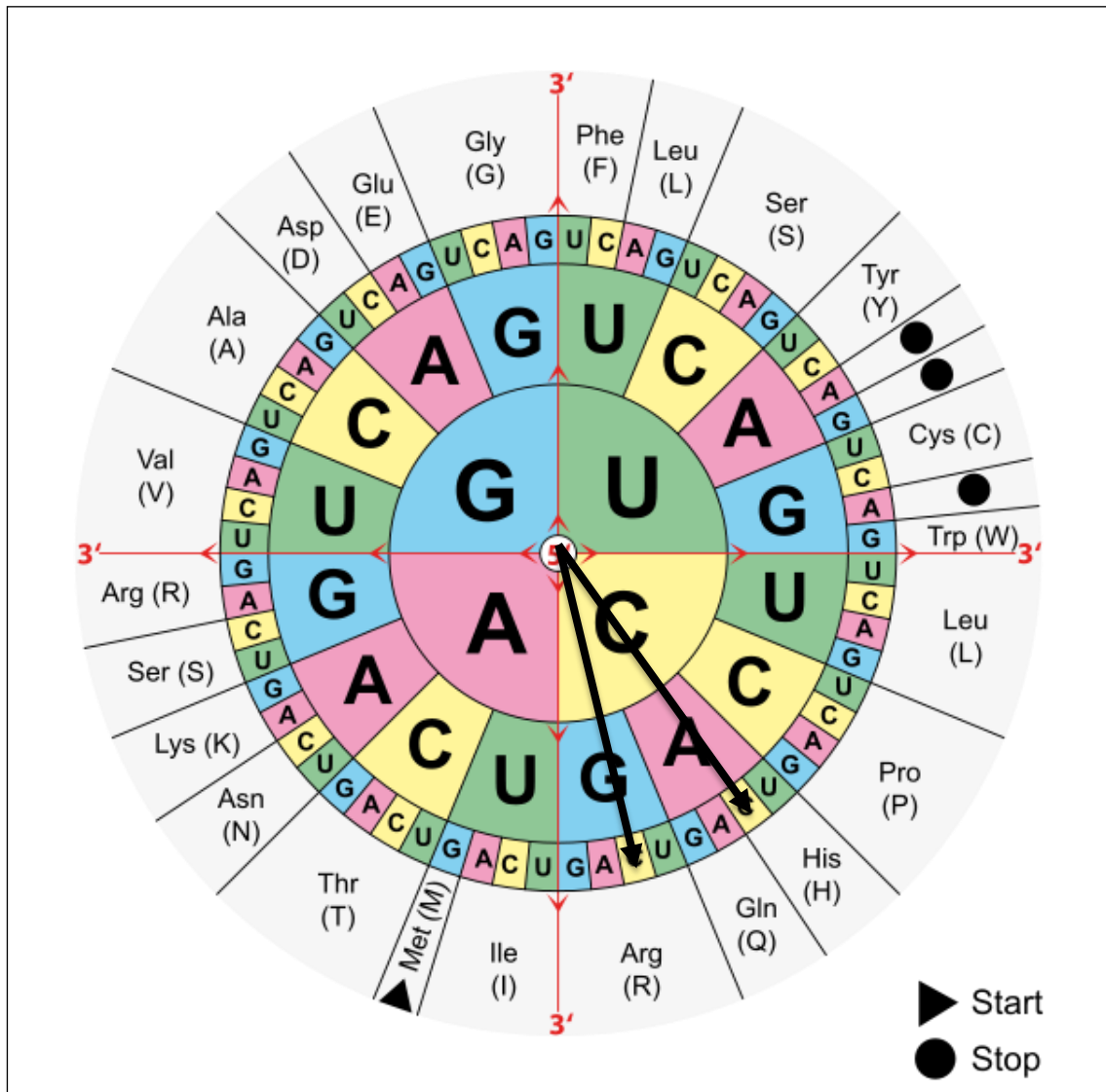


Abb. II.4.17: Aminosäuresonne mit dargestellter Veränderung der Aminosäure durch Transposition der Base (<http://de.wikipedia.org/wiki/Code-Sonne>).



7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC	Summe
					X			X						2	2
					X	X	X	X						3	3
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7		=10



Abb. II.4.18: Familie V-EDA-3. Proband III:1 im Alter von 19 Jahren. Enface-Bild, Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.



6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC	Summe				
		X	X	X			X	X	X				<table><tr><td>14</td><td>14</td></tr><tr><td>19</td><td>19</td></tr></table>	14	14	19	19	=66
14	14																	
19	19																	
		X		X	X	X	X		X									
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7					



Abb. II.4.19: Familie V-EDA-3. Proband III:2 im Alter von 17 Jahren. Enface-Bild, Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

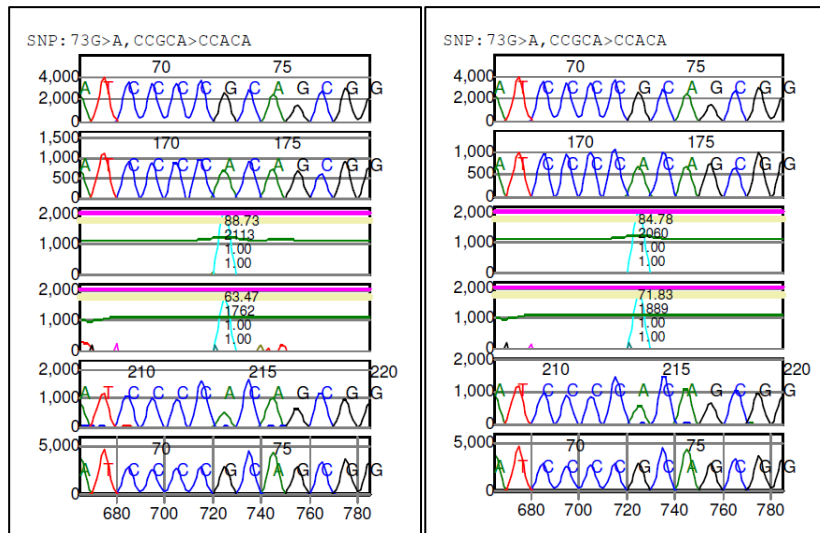


Abb. II.4.20: Ergebnisse der Probanden III:1 (links) und III:2 (rechts) der Familie V-EDA-3. Die oberen Graphiken zeigen die Ergebnisse bei Verwendung des Forward-Primers, die unteren Graphiken stellen die Ergebnisse nach Verwendung des Reverse-Primers dar. SNP im Exon 7. Durch Substitution der Base Guanin durch Adenin kommt es zur Bildung der Aminosäure Histidin anstelle von Arginin an der Aminosäureposition 289 (Arg289His).

7 6 5 4 3 2 1							1 2 3 4 5 6 7	TAC		Summe
					X			X		=8
					X			X		
7 6 5 4 3 2 1							1 2 3 4 5 6 7	2	2	=8
								2	2	

Abb. II.4.21: Familie V-EDA-3. Proband III:4 im Alter von 8,5 Jahren. FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben. Bei dieser Patientin waren im Milchgebiss ebenfalls in keinem Quadranten seitliche Schneidezähne angelegt.

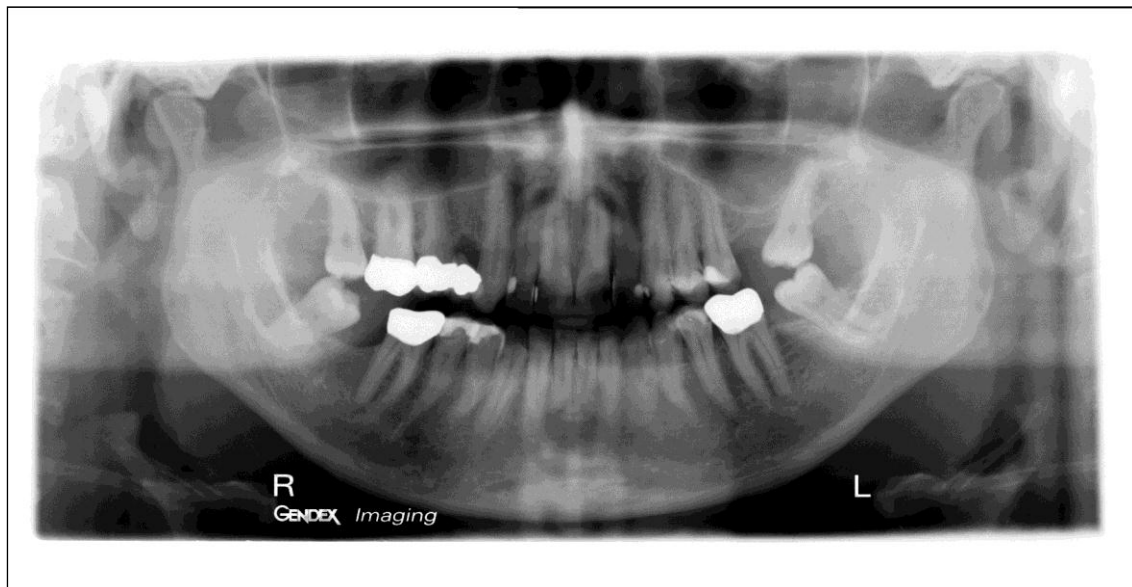


Abb. II.4.22: Familie V-EDA-3. OPG des Probanden II:4 im Alter von 35 Jahren.

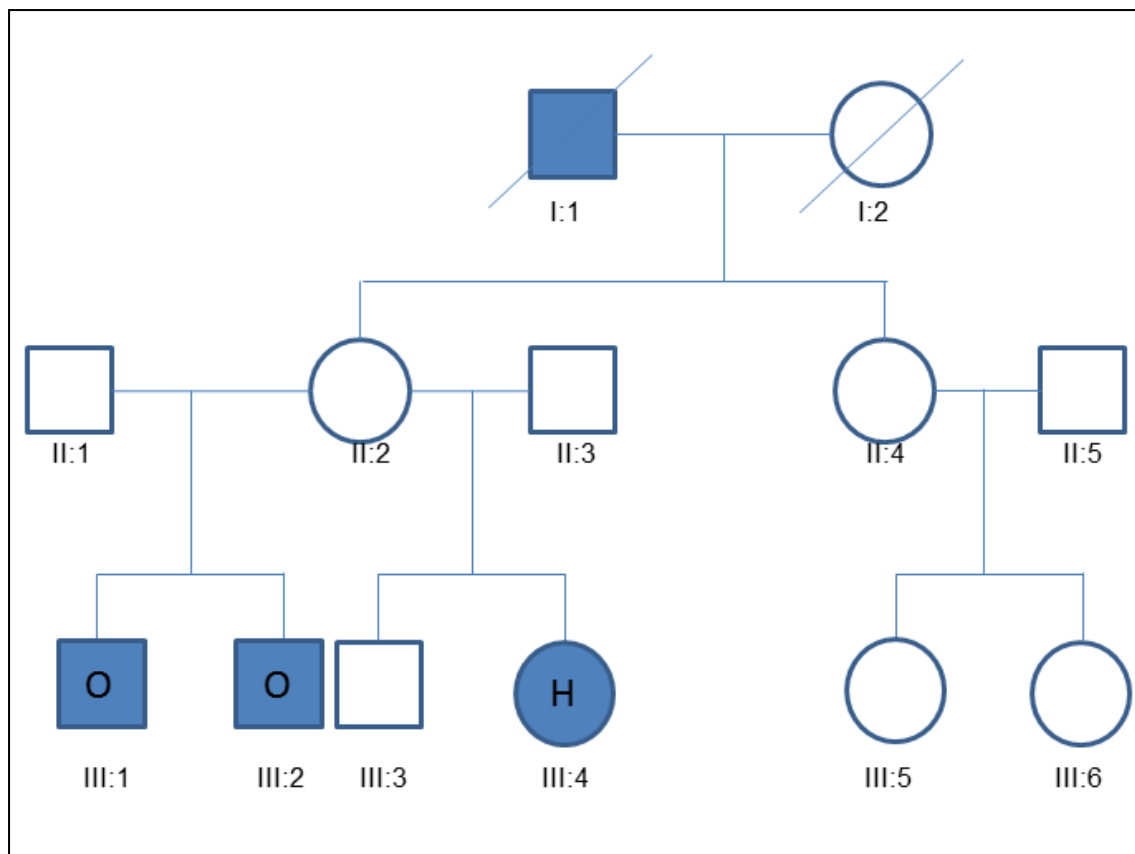
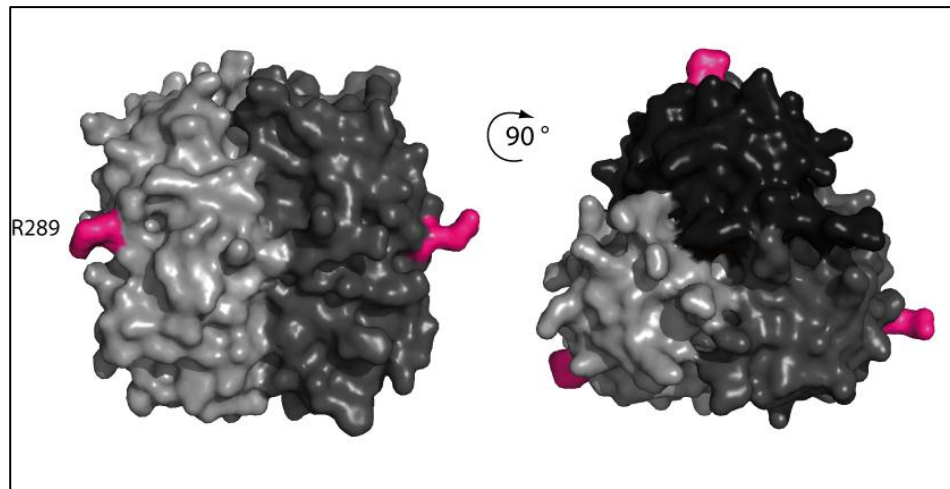
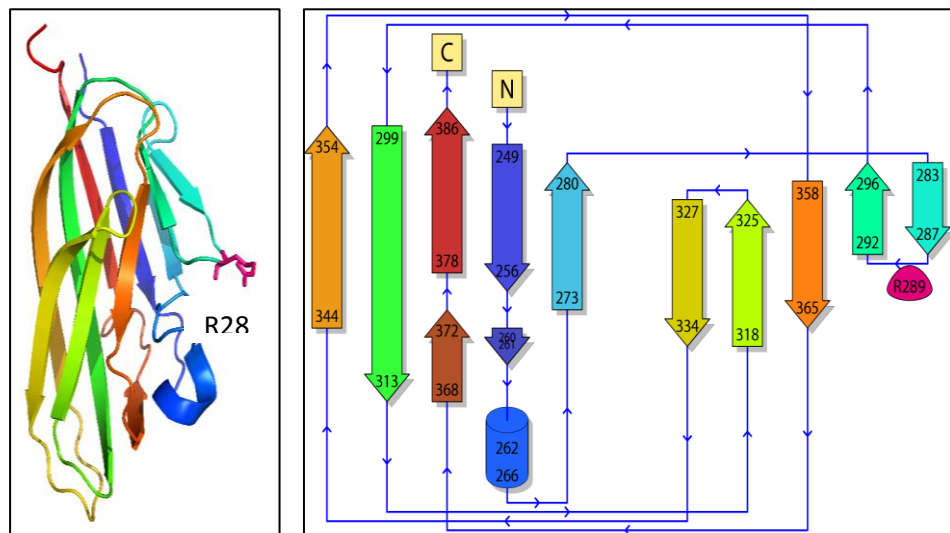


Abb.: II.4.23: Familienstammbaum der Familie V-EDA-3.



(A)



(B)

(C)

Abb. II.4.24: (A) Modell eines EDA Trimers. (B) Banddarstellung (links) und (C) Darstellung der räumlichen Struktur des EDA Monomers. Darstellung der Oberfläche. Die neue Punktmutation (G866A) bedingt die EDA Variante R289H. Die Position R289 ist pink markiert. Sie ist an einer Beta- Haarnadelstruktur lokalisiert welche aus dem Kern heraussticht. Vermutlich vermittelt diese Protein-Protein-Verbindungen. Die EDA Variante R289H verhindert diese Interaktion (in Zusammenarbeit mit Dr. Wolfgang Wende, Institut für Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen, Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen).

II.4.2.3 Verdachtsdiagnose AXIN2-Mutation

Im Probandengut fanden sich drei Familien mit Verdacht auf AXIN2-Mutation (Familie V-AXIN2-1 bis Familie V-AXIN2-3). Nach Ruf et al. (2013) liegen die TAC-Summen in 90% der Fälle bei ≥ 250 ; aber bei 0% mindestens in einen Quadranten ein TAC-Wert von 112 (s. Abb.5, S.177). Ein TAC-Wert von 112 in mindestens einem Quadranten spricht allerdings in 72,7% der Fälle für eine PAX9 Mutation.

Bei keinem Patienten mit der Verdachtsdiagnose AXIN2 wurden Mutationen des Gens AXIN2 gefunden.

II.5 Diskussion

Das Ziel dieser Studie war die Validierung der im systematischen Review (Teil I) gefundenen Ergebnisse, d.h. die Überprüfung, ob die Prognose des Oligodontiegenotyps anhand des entsprechenden Oligodontiephänotyps möglich ist und falls ja, mit welcher Zuverlässigkeit.

Alle Oligodontiepatienten der Abteilung, die der Teilnahme an der Studie zustimmten (n=20) sowie gegebenenfalls deren Familienangehörige, wurden ausschließlich prognosespezifisch getestet, d.h. nur auf Mutation desjenigen Gens überprüft, dessen Mutation gemäß des vorliegenden Tooth Agenesis Codes (TAC) auf der Grundlage der Ergebnisse des systematischen Review vorzuliegen schien. Im untersuchten Oligodontie-Patientengut lagen folgende Verdachtsdiagnosen vor: 55% MSX1, 30% EDA, 15% AXIN 2, 0% PAX9. Alle auf dieser Basis gefundenen Mutationen sind in Tabelle II.5.1 gelistet.

Die Vermutung, eine phänotypbasierte Genotypprognose in unserem Patientengut zu treffen, lässt sich nicht verifizieren: Von 20 Patienten zeigte sich bei zwei von insgesamt sechs Patienten mit EDA-Verdachtsdiagnose eine Mutation im EDA-Gen, bei vier von elf MSX1-Patienten wurde ebenfalls eine Genveränderung im MSX1-Gen entdeckt: Dies bedeutet, dass sich bei lediglich 10% der untersuchten Patienten die gestellte Verdachtsdiagnose bewahrheitete, da nur die EDA-Mutation vermutlich pathologisch ist (vgl. Tab. II.5.1). Dem gegenüber gestellt ist es unwahrscheinlich, dass die gefundenen Veränderungen im MSX1-Gen ursächlich an der Oligodontie beteiligt sind. Ein Unterschied zur Gesamtbevölkerung findet sich nicht, dies zeigen die Ergebnisse der Datenbank Ensembl (www.ensembl.org): Die MSX1-Genvarianten sind laut Ensembl nicht pathologische Normvarianten. Die gefundenen Veränderungen des MSX1-Gens zeigen sich zu 13 respektive 19% in der Gesamtbevölkerung, weshalb diese wahrscheinlich nicht ursächlich für die Oligodontie sind. Deshalb werden diese nicht in die Gruppe der erfolgreich verifizierten Verdachtsdiagnosen eingeordnet. Bemerkt werden muss allerdings, dass die Kombination der beiden SNPs in der Datenbank Ensembl nicht gelistet ist. Die in der vorliegenden Studie gefundene Hitwahrscheinlichkeit ist trotz der geringen Erfolgswahrscheinlichkeit dennoch möglicherweise aufgrund der prognosespezifischen Testung erhöht.

Tab. II.5.1: Tabellarische Darstellung aller gefundenen Mutationen innerhalb der Verdachtspopulation von Oligodontiepatienten, ihrer in der Datenbank Ensembl angegebenen Häufigkeit, der realen Häufigkeit dieser Mutationen innerhalb der Gesamtpopulation von Oligodontiepatienten, der Häufigkeit mit der eine Mutation dieses Gens in der Gesamtpopulation von Oligodontiepatienten vermutet worden war sowie der Pathogenität der jeweiligen Mutation.

Gen/Exon	Mutation	Häufigkeit Ensembl	Reale Häufigkeit (n=20)	Häufigkeit Mutations- verdacht Gen (n=20)	Status
EDA Exon7	Arg289Cys c.866G>A 69.253321 G>A	0	10%	30%	pathologisch
MSX-1 Exon 1	Ala40Gly (SNP) c.119C>CG 4.861745 T>C	13%	10%	55%	nicht pathologisch
MSX-1 Exon 1 + Exon 2 (NCA)	3'UTR- Variante. 4.864876 T>C Kombination mit Ala40Gly (SNP) c.119C>CG 4.861745 T>C	Kombi- nation unbe- kannt 3'UTR Variante alleine (19,1%)	10%	55%	unbekannt 3'UTR Variante alleine: keine funktionellen Folgen/nicht pathologisch

NCA: non-coding area

Bei den drei Patienten (15%) mit Verdacht auf AXIN2 Mutation konnte in keinem Fall eine entsprechende Mutation verifiziert werden.

Bei den elf Patienten (55%) mit MSX1-Mutationsverdacht wurden ausschließlich gemäß Ensembl nicht pathologische Genvarianten gefunden. Es handelte sich um zwei Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNP): eine 3'UTR Variante auf Exon 2 (4.864876 T>C) sowie eine Missense-Variante der Aminosäuresequenz an der Position 40 des Exon 1 (Ala40Gly). Bei zwei Patienten (10%) lag ausschließlich die Exon 1-Variante vor und bei zwei Patienten (10%) die Exon 1-Variante in Kombination mit der Exon 2-Variante.

Nur bei den sechs Patienten (30%) mit EDA-Mutationsverdacht konnte in zwei Fällen (Brüder) eine EDA-Mutation bestätigt werden. Die EDA-Gensequenzierung ergab in den positiven Fällen eine neue, zuvor in der Literatur noch nicht beschriebene Punktmutation (Arg289His), die gemäß weiterführender Analysen vermutlich die Protein-Protein Interaktion von EDA beeinträchtigt und demzufolge höchstwahrscheinlich als pathologisch zu klassifizieren ist.

Insgesamt konnte somit die phänotypbasierte Genotypprognose nur in 33,3% der EDA-Verdachtspatienten und in 10% der Oligodontiepatienten bestätigt werden. Es zeigte sich also, dass eine phänotypbasierte Genotypprognose in der hier durchgeführten Art und Weise nicht, respektive nur in Einzelfällen möglich war und dementsprechend keine klinische Relevanz besitzt.

Es stellt sich daher die Frage, warum dieser in der Literatur (s. Teil I) scheinbar existente und scheinbar auch ziemlich eindeutige Zusammenhang zwischen Oligodontiephänotyp und -genotyp in einem weitestgehend unselektierten Oligodontie-Patientengut nicht nachweisbar ist.

Der folgenden Diskussion vorangestellt werden muss die Tatsache, dass die Ergebnisse der vorliegenden Studie nur schwer bis gar nicht mit der existenten Literatur vergleichbar sind. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie haben alle bisher in der Literatur publizierten klinischen Studien und/oder Fallberichte zur genetischen Grundlage der Oligodontie das Prinzip verfolgt, ein bestimmtes Patientengut, egal ob eine Familie, mehrere Familien oder ein mehr oder weniger großes Oligodontiepatientengut pauschal auf das Vorliegen von Mutationen in einem oder mehreren Genen zu untersuchen. Mit anderen Worten, alle jeweils untersuchten

Patienten und/oder Probanden wurden auf das Vorliegen von Mutationen in allen im Rahmen der Studie analysierten Genen geprüft. Mögliche Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp wurden zwar mehrfach und durchaus übereinstimmend zwischen unabhängigen Studien beschrieben, jedoch wurde deren Zusammenhang nie verifiziert.

In der vorliegenden Studie wurde - im Gegensatz zur bisherigen Literatur - versucht, einen auf dem Tooth-Agenesis-Code, d.h. dem individuellen Phänotyp eines Oligodontiepatienten basierenden Mutationsverdacht für ein spezifisches Gen und zwar exklusiv nur für dieses Gen, zu verifizieren. Eine vergleichbare Studie existiert bisher nicht. Auch das Systematische Review (Teil I) und somit genaugenommen die Grundlage für die Mutationsprognose basiert ausschließlich auf Studien, die pauschal bestimmte Gene auf Mutationen überprüften.

Entsprechend ist auch kein direkter Vergleich der gefundenen Häufigkeit von Mutationen bestimmter oligodontieverursachender Gene zwischen der vorliegenden Studie und der Literatur möglich. Dies gilt auch für Studien, die wie Arcuri et al. (2011), Bergendal et al. (2011), Boeira Junior et al. (2013), Paixão-Côrtes et al. (2011) und Zhu et al. (2012) zumindest dahingehend einen vergleichbaren Ansatz verfolgten, als sie in Analogie zur vorliegenden Studie ein weitestgehend unselektiertes Oligodontiepatientengut analysiert haben. Jedoch erfolgte wie bereits oben mehrfach betont eine phänotypunabhängige pauschale Analyse bestimmter Gene auf Mutationen.

Genotyp-Phänotyp-Assoziation bei non-syndromaler Oligodontie

Der auf der Grundlage der Literatur (s. Teil I) vermutete und scheinbar relativ deutliche Zusammenhang zwischen Oligodontiephänotyp und -genotyp konnte, wie oben bereits erwähnt, in dem vorliegenden weitestgehend unselektierten Oligodontie-Patientengut nicht bestätigt werden, da eine phänotypbasierte Genotypprognose nur in 33,3% der EDA-Verdachtspatienten und somit 10% der Oligodontiepatienten erfolgreich war.

Mögliche Ursachen dafür, dass in der vorliegenden Studie keine Assoziation zwischen Genotyp und Phänotyp gefunden werden konnte sind:

1. das Probandengut des Systematischen Reviews war nicht repräsentativ
2. das Probandengut der vorliegenden Studie war nicht repräsentativ
3. die Ursache non-syndromaler Oligodontien ist nicht in allen Fällen monogen
4. es existiert gar keine Assoziation zwischen Phäno- und Genotyp bei non-syndromalen Oligodontien

ad 1) Repräsentativität des Probandengutes des Systematischen Reviews

In der Tat liegt die Vermutung nahe, dass das Patientengut der dem Systematischen Review (SR) und der daraus resultierenden Meta-Analyse (MA) zugrundeliegenden Studien unter mehreren Gesichtspunkten offensichtlich nicht repräsentativ für ein unselektiertes Oligodontiepatientengut und somit auch nicht für die Grundgesamtheit der Oligodontiepatienten war.

Mit Ausnahme weniger Studien (Arcuri et al. 2011, Bergendal et al. 2011, Song et al. 2009, Zhu et al. 2012) im systematischen Review und ohne Ausnahme bei der Meta-Analyse war das Patientengut der Studien eindeutig selektiert. Meist handelte es sich um eine oder mehrere Familien mit hoher familiärer Penetranz der Oligodontie über zwei oder mehrere Generationen sowie teilweise überproportional vielen Nichtanlagen (Ayub et al. 2010, Chalothorn et al. 2008, Das et al. 2003, Frazier-Bowers et al. 2002, Han et al. 2008, Hansen et al. 2007, Li et al. 2008, Lidral et al. 2008, Mostowska et al. 2006, Rasool et al. 2008, Stockton et al. 2000, Tao et al. 2006, Tarpey et al. 2007, Vastardis et al. 1996). Mit anderen Worten, unabhängig vom betroffenen Gen, war die Mutation des oligodontieverursachenden Gens derart pathogen respektive der Funktionsverlust des Proteins so ausgeprägt, dass eine Kompensation der Mutationsfolgen bzw. eine Modulation derselben durch epigenetische und/oder exogene Faktoren nicht möglich war. Des Weiteren bedeutet dies, dass de novo Mutationen so gut wie nicht in der Literatur beschrieben wurden. Wie so oft, ist also auch hinsichtlich der genetischen Ursache der Oligodontie von einem Publikationsbias zugunsten positiver, sensationeller Ergebnisse auszugehen.

Dass die Ergebnisse des SR/MA nicht auf ein weitestgehend unselektiertes Patientengut übertragbar waren, zeigt sich auch beim Vergleich der Häufigkeit betroffener Gene. Gemäß der MA werden Oligodontien am häufigsten durch Mutationen von PAX9, gefolgt von EDA, MSX1 und AXIN2 verursacht. Die relativen Häufigkeiten betragen hierbei 35,9% PAX9, 38,0% EDA, 15,2% MSX1 und 10,9% AXIN2. Die phänotypbasierten Mutationsprognosen der vorliegenden Studie ergaben hingegen ein anderes Bild: 55% MSX1, 30% EDA, 15% AXIN2 und 0% PAX9. Zwar sagt diese Mutationsprognose nichts über die tatsächliche Verteilung der oligodontieverursachenden Mutationen im Gießener Patientengut aus, jedoch erscheint zumindest bemerkenswert, dass kein einziger Patient einen PAX9-Verdacht hatte. Bei der Analyse eines weitestgehend unselektierten Oligodontiepatientengutes (n=93) konnten auch Bergendal et al. (2011) trotz pauschaler Analyse der Gene PAX9, MSX1,

AXIN2, EDA, EDAR sowie EDARADD keine mit dem SR/MA vergleichbare Häufigkeitsverteilung feststellen. Insgesamt wurden nur bei 11% (n=10) ihrer Patienten Mutationen gefunden, die relativen Häufigkeiten waren 40% PAX9, 30% AXIN2, 20% MSX1 und 10% EDARADD. Eine neu veröffentlichte Studie von Arzoo et al. (2014), an welcher auch Bergendal beteiligt war, untersucht erneut das Probandengut der Arbeit von Bergendal et al. (2011). Hierbei zeigen 38,3% der Probanden Mutationen, wobei 27,7% aller Probanden WNT10A Mutationen aufweisen. Die weiteren 10,6% der hier gefundenen Mutationen (10/94) entsprechen den 11% (10/93) der Mutationen aus der 2011 veröffentlichten Studie (EDARADD, AXIN2, MSX1, PAX9). Irritierend ist die Tatsache, dass in der ersten Arbeit 93, in der im Jahr 2013 erschienenen Arbeit 94 Probanden die Kohorte bilden. Dies lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass zu Beginn beider Studien ursprünglich die gleichen 162 potenziellen Probanden kontaktiert wurden. In der Studie von Arzoo et al. (2014) stimmten primär 102 dieser 162 Probanden einer Teilnahme zu. Acht Probanden, welche Geschwister von anderen Probanden waren, durften nicht an der Studie teilnehmen weil die Einschlusskriterien die Teilnahme von Geschwistern nicht erlaubten. Daraus resultieren 94 inkludierte Probanden.

Auch in anderen Studien an weitestgehend unselektierten Oligodontie-Patientengütern, jedoch mit einer auf jeweils ein bis zwei Gene beschränkten Analyse (Arcuri et al. 2011, Paixão-Côrtes et al. 2011, Song et al. 2011, Zhu et al. 2012), war die Häufigkeit von Patienten mit positiven Mutationsbefunden sehr variabel (0%-40%). Diesbezüglich muss ferner bedacht werden, dass die beiden Studien mit der höchsten positiven Mutationshäufigkeit – Song et al. (2011) mit 27% und Zhu et al. (2012) mit 40% - jeweils Patienten mit sehr ausgeprägten Phänotypen, d.h. einer überproportional hohen Anzahl an Nichtanlagen analysierten. Mit anderen Worten, diese Patientengüter waren nicht repräsentativ für ein durchschnittliches Oligodontiepatientengut.

ad 2) Repräsentativität des Probandengutes der vorliegenden Studie

Unabhängig bzw. zusätzlich zur Frage der Repräsentativität der Ergebnisse des SR/MA, stellt sich naturgemäß auch die Frage nach der Repräsentativität des untersuchten Patientengutes.

In aller Regel wird in diesem Zusammenhang zunächst die Größe des Patientengutes hinterfragt. In den Studien mit weitestgehend unselektierten Oligodontiepatientengütern (Arcuri et al. 2011, Bergendal et al. 2011, Boeira-Junior et al. 2013, Paixão-Cortes et al. 2011, Song et al. 2009, Zhu et al. 2012) variierte die Anzahl der Patienten mit Oligodontie zwischen vier und 94 und betrug im Median 15. Somit war das vorliegende Patientengut (n=20) sogar verhältnismäßig groß.

Nichtsdestotrotz wäre ein Patientengut mit 20 Individuen nicht geeignet, um repräsentative Daten zur relativen Häufigkeit der verschiedenen genetischen Ursachen der Oligodontie zu liefern. Für die zugrunde liegende Fragestellung, ob eine phänotypbasierte Genotypprognose grundsätzlich möglich ist, war es jedoch höchstwahrscheinlich groß genug. Nicht groß genug war es hingegen, um die Zuverlässigkeit einer solchen Prognose genspezifisch zu ermitteln, weshalb vor allem der Anteil positiver Prognosen im EDA-Klientel (33,3%) vorsichtig bewertet werden sollte und es vor einer Verallgemeinerung weiterer Bestätigungen an anderen Patientenkohorten bedarf.

Inwiefern das vorliegende Patientengut für eine „normale“ non-syndromale Oligodontiepatientenpopulation repräsentativ war, lässt sich auf der Grundlage des derzeitigen Wissensstandes vermutlich gar nicht beantworten, da bisher genaugenommen unklar ist, was eigentlich normal ist, denn wie bereits oben erwähnt, liegt hinsichtlich der Daten in der Literatur offensichtlich ein ausgeprägter Publikationsbias vor.

Zweifelsfrei war die familiäre Penetranz der Oligodontie im vorliegenden Patientengut viel geringer als im SR/MA. Nur bei der einen Familie bei welcher die neue EDA-Punktmutation entdeckt wurde, konnte eine Oligodontie in früheren Generationen zumindest anamnestisch bestätigt werden. Bei allen anderen Familien lagen in derselben und/oder in früheren Generationen lediglich und per definitionem mindestens die geforderten Hypodontien vor. Mit anderen Worten, die Pathogenität der zugrundeliegenden Mutationen war im vorliegenden Patientengut offensichtlich

geringer als im SR/MA. Dies erklärt im Umkehrschluss nicht nur die höhere Variabilität hinsichtlich der Anzahl der Nichtanlagen zwischen den Generationen (hypodont versus oligodont) im vorliegenden Patientengut, sondern möglicherweise auch die größere Variabilität des Oligodontie-Phänotyps im Vergleich zum SR/MA. Auch Bergendal et al. (2011) machten die Beobachtung, dass die mutationspositiven Oligodontiepatienten signifikant ($p < 0.05$) häufiger eine positive oligodonte Familienanamnese hatten als die mutationsnegative Gruppe (40% versus 13%), während der Anteil der Patienten mit hypodonter Familienanamnese in beiden Gruppen nahezu identisch war (60% versus 63%).

Auch sind ethnische Unterschiede hinsichtlich der genetischen Ursache bzw. deren relativer Häufigkeit zwischen der vorliegenden Studie und der Literatur nicht auszuschließen. Das Patientengut dieser Studie unterlag keinen ethnischen Restriktionen hinsichtlich der Einschlusskriterien. Das Material war aber aufgrund des Patienteneinzugsgebietes des Untersuchungsortes überwiegend kaukasischer Abstammung. Die Familie mit der bestätigten EDA-Mutation hatte einen afroamerikanischen Hintergrund väterlicherseits und eine Familie mit MSX1-Mutationsverdacht war türkischer Abstammung.

Während für Kaukasier in Abhängigkeit vom Geschlecht und der geographischen Lokalisation Nichtanlagehäufigkeiten zwischen 3,2% und 7,6% beschrieben werden (Polder et al. 2004), zeigen Arbeiten von Al Emran et al. (1990) sowie von Salem et al. (1989) eine etwas geringere Prävalenz für Nichtanlagen im arabischen Raum (2,2%-4%) und die Arbeit von Davis et al. (1987) eine etwas höhere Prävalenz für den asiatischen Raum (6,6-7,6%). Letzteres scheint vor allem auf die Prävalenz von EDA-bedingten Nichtanlagen in der asiatischen Bevölkerung (Polder 2004, Zhang et al. 2009) zuzutreffen. Die Tatsache, dass bei Asiaten häufiger die mittleren unteren Schneidezähne fehlen, scheint diesen Verdacht gemäß Nieminen (2007) zu bestätigen. Auch die Ergebnisse des Systematischen Reviews (s. Teil I) sprechen, trotz oben bereits erwähnter eingeschränkter Übertragbarkeit auf die Gesamtpopulation, dafür. Fan et al. (2008) berichten, dass bis zum Zeitpunkt des Erscheinens ihrer Studie 14 verschiedene HED (hypohydrotische ektodermale Dysplasie) verursachende EDA-Mutationen bei chinesischen Patienten mit naturgemäß syndromaler Oligodontie gefunden wurden. Konkrete Angaben zur relativen Häufigkeit von Mutationen der Gene EDA, MSX1, PAX9 und AXIN2 in verschiedenen Populationen existieren gemäß meines Wissens nicht. Die in Teil I beschriebenen Häufigkeiten liegen keinen ethnischen Restriktionen zugrunde, weshalb diese Daten

hier nicht verwendet werden können. Es fällt dennoch auf, dass sich einige Studien, so zum Beispiel Ichikawa et al. (2006) mit der Häufigkeit von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten beschäftigen und beschreiben, dass diese vermehrt im asiatischen Raum auftreten. Butali et al. (2011) beschreiben eine höhere Prävalenz für Lippen-Kiefer-Gaumenspalten in Lateinamerika und Asien im Vergleich zu Südeuropa, Südafrika und Israel. MSX1-Mutationen sind eine häufig genannte Ursache für Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (van den Bogaard et al. 2000, Dixon et al. 2011, Jezewski et al. 2003, Prasad et al. 2012, Tongkobpetch et al. 2006), weshalb hier möglicherweise auch MSX-1 bedingte Oligodontien im Vergleich zu anderen Mutationen häufiger auftreten könnten.

Die aktuelle Studienlage unterstreicht diese Vermutung allerdings nur sehr schwach: Jezewski et al. (2003) und Tongkobpetch et al. (2006) finden in jeweils 2% ihrer untersuchten Probandengruppe MSX1-Mutationen. Obwohl dies keine besonders hohen Prozentangaben sind, sollte berücksichtigt werden, dass für viele non-syndromale Spalten noch keine Ursache gefunden wurde. Van den Boogaard et al. (2000) weisen in einer niederländischen Familie mit zwölf Spaltträgern 100% MSX1-Mutationen nach. Zwölf von 15 Familienangehörigen sind Spaltträger. Alle zwölf Probanden zeigen eine Nonsense-Mutation im MSX1-Gen, welche für ein Stoppcodon kodiert.

Da für das SR/MA keine einheitliche Ethnie existiert, könnte vermutet werden, dass Nordeuropäer vielleicht weniger mutationsbedingte Oligodontien zeigen und die Angaben im SR/MA evtl. durch andere Ethnien (z.B. Asiaten) beeinflusst wurden.

So zeigt sich, dass bei Eingabe des Suchbegriffes „non-syndromic oligodontia“ in der elektronischen Datenbank Pubmed 38 von 88 Suchergebnissen aus dem asiatischen Raum stammen, diese entsprechen 43% aller gefundenen Suchergebnisse. Studien aus Europa finden sich zu 39,5% (n=35) wohingegen Studien aus den USA/Südamerika seltener sind (17%, n=15). Auffällig ist, dass die meisten neuen Studien aus Asien kommen (15 der neuesten 20 Studien stammen aus Asien).

ad 3) Die Ursache non-syndromaler Oligodontien ist nicht monogen

Betrachtet man die Häufigkeit, mit der Mutationen unserer Kandidatengene in weitestgehend unselektierten Oligodontiepatientengütern identifiziert werden konnten, so fällt unabhängig von der nicht gegebenen Vergleichbarkeit von Ergebnissen aus Studien mit einer pauschalen Mutationstestung bzw. einer phänotypbasierten Mutationstestung auf, dass die Mutationen der bis zu Studienbeginn häufigsten in der Literatur beschriebenen Gene (PAX9, MSX1, EDA, EDAR, EDARADD, AXIN2) nur rund 10% der Oligodontiefälle erklären könnten (Bergendal et al 2011). Schon aus diesem niedrigen Prozentsatz wird deutlich, dass entweder andere Gene, oder mehrere statt nur einem Gen (Polygenie) oder in einem vermehrten Maß diverse exogene oder epigenetische Faktoren eine Oligodontie bedingen müssen. Mit anderen Worten, der genetische Hintergrund von Oligodontien ist wahrscheinlich viel variabler als gemeinhin angenommen wird. Gleiches gilt für die Pathogenität bzw. das Ausmaß des Funktionsverlustes des oligodontiebedingenden Proteins.

Die oben genannte Vermutung hinsichtlich eines anderen, zusätzlichen genetischen Hintergrundes von Oligodontien, konnte wie bereits erwähnt, in nach dem Beginn dieser Studie publizierten Ergebnissen zu WNT10A-Mutationen bestätigt werden.

Die Arbeitsgruppe von Arzoo et al. (2014) zeigt, dass 27,7% der Oligodontiepatienten ihrer Kohorte eine WNT10A-Mutation tragen. Probanden, bei denen zwei Allele betroffen sind, zeigen signifikant mehr Nichtanlagen als Probanden mit nur einem betroffenen Allel (Arzoo et al. 2014).

Mostowska et al. (2013) konnten bei der Untersuchung der Gene MSX1, PAX9 und WNT10A sogar bei 62% ihrer hypo- und oligodonten Probanden (26/42) WNT10A Mutationen finden, bei einem einzigen Probanden entdeckten sie eine neue PAX9-Mutation, kein einziger Patient dieser Kohorte zeigt eine MSX1-Mutation. Es fällt auf, dass die durchschnittliche Zahl der Nichtanlagen bei der Gruppe mit WNT10A Mutation bei 12,3 liegt, während die durchschnittliche Nichtanlagenzahl der Gruppe, in der keine Mutationen gefunden wurden, 7,7 beträgt.

Van den Boogaard et al. (2012) analysieren die Gene WNT10A, MSX1, PAX9, IRF6 und AXIN2 in einer Gruppe von 34 Probanden, insgesamt finden sie bei 71% der Probanden Mutationen (56% WNT10A, 3% MSX1, 9% PAX9, 3% AXIN2). Auch van den Boogaard et al. (2012) geben eine vergleichsweise hohe Anzahl von Nichtanlagen

an: Bei non-syndromalen Agenesien mit WNT10A-Mutation fehlen durchschnittlich 15,6 Zähne (10-28 Zähne) (van den Boogaard et al. 2012). Die Einschlusskriterien des Artikels von van den Boogaard et al. (2012) geben zwar an, dass mindestens sechs bleibende Zähne kongenital fehlen müssen, allerdings wird nicht betont, dass dies exklusive der Weisheitszähne gilt. Man könnte also davon ausgehen, dass bei dem hier angegebenen Terminus „Hypodontie“ Probanden mit mindestens vier Nichtanlagen exklusive der dritten Molaren inkludiert wurden.

Eine weitere aktuelle Arbeit von Song et al. (2014) untersucht hypodonte Probanden: Die Probanden werden je nach der Anzahl der Nichtanlagen (1-3 respektive 4 oder mehr Nichtanlagen) in zwei Gruppen geteilt. In der Gruppe mit jeweils 1-3 Nichtanlagen liegen zu 15,8% WNT10A Mutationen vor. Demgegenüber gestellt finden sich 51,6% WNT10A Mutationen in der Gruppe mit vier oder mehr Nichtanlagen.

Alle vier Arbeiten (Arzoo et al. 2014, Mostowska et al. 2013, Song et al. 2014, van den Boogaard et al. 2012) deuten darauf hin, dass WNT10A-Mutationen vermutlich einen Phänotyp mit relativ vielen Nichtanlagen bedingen. Unterstützt wird diese Theorie auch durch die Arbeit von Bergendal et al. (2011): Bei 11% (10/93) ihrer Probanden fanden sie Mutationen in den Genen EDARADD, AXIN2, MSX1 und PAX9. Die durchschnittliche Zahl der Nichtanlagen beträgt 9,5 (6-18 Nichtanlagen). Dieser Wert ist bedeutend niedriger als der sich auf WNT10A Mutationen beziehende Wert von van den Boogaard (durchschnittlich 15,6 Nichtanlagen bei einer Variation zwischen 10-28 Zähnen). Mostowska et al. (2013) geben wie bereits erwähnt durchschnittlich 12,3 Nichtanlagen für die Probanden mit WNT10A-Mutation und durchschnittlich 7,7 Nichtanlagen für die Probanden ohne entdeckte Mutation an. Die durchschnittliche Anzahl der Nichtanlagen der Probanden unserer Studie beträgt 8,6 (6-19 Zähne). Er befindet sich damit eher im niedrigen Bereich und lässt sich aus diesem Grund mit der Probandengruppe von Bergendal et al. (2011) vergleichen, bei der nur in 10% Mutationen gefunden wurden.

ad 4) Es existiert kein Zusammenhang zwischen Oligodontie-Phänotyp und -Genotyp bei non-syndromaler Oligodontie

Geht man davon aus, dass es keine Assoziation zwischen dem Geno- und dem Phänotyp bei non-syndromalen Oligodontien gibt, dann müssen im Umkehrschluss alle Oligodontien zumindest eine nicht genetisch begründete Teilursache haben. Die Existenz einer solchen ist wahrscheinlich. Bedenkt man die existierenden endo- als auch exogenen Ursachen mancher Erkrankungen, so fällt auf, dass beispielsweise fast allen Krebserkrankungen eine innere oder eine äußere Genese zugrunde liegen kann (selbst wenn sich diese später auch genetisch manifestiert). So sind 10% der Kolonkarzinome auf genetische Faktoren zurückzuführen (MLP, Duale Reihe, Innere Medizin, 2. Auflage, 2009). Durch Mutation von DNA-Repair Genen (MSH2, MLH1) kann es zur Entstehung des hereditären kolorektalen Karzinoms ohne Polyposis (HNPCC) kommen (MLP, Duale Reihe, Innere Medizin, 2. Auflage, 2009).

Magenkarzinome haben ebenfalls endo- und exogene Ursachen. Träger der Blutgruppe A haben ein erhöhtes Risiko, an einem Magenkarzinom zu erkranken. Negative als auch positive Umwelteinflüsse basieren zum großen Teil auf Ernährungsgewohnheiten. (MLP, Duale Reihe, Innere Medizin, 2. Auflage, 2009). Gleiches gilt für Mammakarzinome: bei 5-10% der Erkrankungen sind Mutationen der Gene BRCA1 oder BRCA2 nachweisbar, welche krankheitsauslösend wirken. Neuralrohrdefekte haben durch den Folsäuremangel eine zum größten Teil exogene Ursache; allerdings kann auch eine Resorptionsstörung durch Entzündung des Dünndarms und in der Folge (www.medicoconsult.de/wiki) eine endogene Ursache vorliegen. Die Wirbelsäulenerkrankung Morbus Scheuermann kann endogen durch kollagene Stoffwechselstörungen oder hormonelle Veränderungen entstehen und exogen durch falsche Haltung und Fehlbelastungen der Wirbelsäule verursacht werden (http://www.onmeda.de/krankheiten/morbus_scheuermann.html).

Exogene Faktoren, welche bei der Oligodontiegenese eine Rolle spielen, sind beispielsweise „Infektionen im Keimgebiet oder eine Keimschädigung durch Trauma oder Bestrahlung“ (Schopf 2008), aber auch Rötelnembryopathien (Diedrich 2000).

Dass auf der anderen Seite Nichtanlagen und somit auch Oligodontien zumindest teilweise eine endogene Komponente haben müssen, konnte experimentell in Studien mit Knockout-Tieren bewiesen werden (Peters et al. 1998, Satokata und Maas 1994). So zeigen Peters et al. (1998) unter anderem, dass die Zahnentwicklung bei Mäusen

mit fehlendem PAX9-Gen im Knospenstadium arretiert. Satokata und Maas (1994) beschreiben die Entstehung von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten bei MSX1-Knockout-Mäusen: Hierbei fällt auf, dass beim Fehlen des MSX1-Gens Nichtanlagen der Inzisiven vorliegen. Die Molaren bilden sich ebenfalls nur bis zum Knospenstadium aus.

Ferner finden sich in mehreren Studien verschiedener Arbeitsgruppen und an eindeutig unterschiedlichen Patientenmaterialien bemerkenswerte Übereinstimmungen des Phänotyps bei gleicher genetischer Ursache im Sinne des gleichen betroffenen Gens. Bei vorliegender PAX9-Mutation fehlen häufig Molaren (Bergendal et al. 2011, Das et al. 2002, Das et al. 2003, Frazier-Bowers et al. 2002, Jumlongras et al. 2004, Kim et al. 2006, Lammi et al. 2003, Liang et al. 2012, Nieminen et al. 2001, Stockton et al. 2000, Zhu et al. 2011). Neben der Nichtanlage von Molaren fehlen bei Veränderungen im PAX9-Gen häufig obere Canini (Liang et al. 2012) sowie obere erste Prämolaren (Bergendahl et al. 2011, Kim et al. 2006). AXIN2-Mutationen treten oft mit dem Fehlen von Molaren und Prämolaren auf (Lammi et al. 2004). Ein auffälliges Nichtanlagemuster bei MSX1-Mutationen wurde von Bergendal et al. (2011), Kim et al. (2006), Vieira et al. (2004) und Zhu et al. (2012) gefunden: Häufig fehlen hier obere erste Prämolaren. Bei Vorliegen einer EDA-Mutation wird das Fehlen von Inzisiven beschrieben (Ayub et al. 2010, Han et al. 2008, Mues et al. 2009, Nieminen 2007, Song et al. 2009 und Tao et al. 2006).

Einen spezifischen Tooth-Agenesis-Code bei vorliegender WNT10A Mutation (s. Teil I) konnten van den Boogaard et al. (2012) nicht herausarbeiten. Die am häufigsten fehlenden Zähne waren nach Mostowska et al. (2013) untere zweite Prämolaren, gefolgt von oberen seitlichen Inzisiven, unteren mittleren Inzisiven und oberen zweiten Prämolaren.

Denkbar wäre weiterhin, dass der Genotyp den Phänotyp nur insoweit bestimmt, als dass Nichtanlagen vorliegen. Welche Zähne letztendlich fehlen mag durch eine zusätzliche exogene Ursache bestimmt sein. Wenn man die Ursache einer Nichtanlage sowohl in Umweltfaktoren als auch in genetischen Faktoren sieht, könnte erst das Erreichen eines Schwellenwertes zu dem Phänotyp „Nichtanlage“ führen. Welcher Zahn nun betroffen ist würde unter Umständen vom Zeitpunkt des Auftretens der Noxe abhängen.

Bergendal et al. (2011) fanden in Analogie zur vorliegenden Studie ebenfalls keine signifikante Assoziation zwischen Geno- und Phänotyp in ihrem Probandengut. Sie suchten die Erklärung dafür in verschiedenen Gründen: Zum einen fanden sich in ihrer Studie nur wenige Probanden mit der jeweils gleichen Mutation. Des Weiteren wurden in dieser Studie, wie auch in der hier vorliegenden Studie, keine Patienten mit Hypodontien untersucht. Die Untersuchungsgruppe ist somit kleiner, wodurch die Wahrscheinlichkeit, die Existenz einer Mutationsprognose anhand des Nichtanlagemusters zu finden, sinkt.

Festzuhalten ist, dass in der vorliegenden Studie kein Zusammenhang zwischen Geno- und Phänotyp gefunden wurde. Dies bedeutet aber nicht, dass kein Zusammenhang existiert, da wie oben beschrieben, auch die Repräsentativität des Probandenguts des SR/MA als auch die des Patientenguts der hier vorliegenden Studie neben exogenen sowie möglicherweise polygenen Ursachen als Grund dafür gesehen werden können, dass keine Assoziation des Geno- und des Phänotyps gefunden wurde.

Die negativen Ergebnisse hinsichtlich der prognosespezifischen Mutationstestung schließen daher in keiner Weise aus, dass eine andere Mutation vorliegt. Aufgrund aktueller Untersuchungen sind, wie bereits oben erwähnt, bei einem Teil der Oligodontiepatienten höchstwahrscheinlich WNT10A-Mutationen der potentielle Auslöser der Oligodontie (Arzoo et al. 2014).

Nur durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) ließen sich die potentiellen Auslöser bestmöglich identifizieren. Ob sich durch genomweite Assoziationsstudien jedoch eine Genotyp-/Phänotypassoziation nachweisen lässt, ist nicht gesichert.

Novelmuation EDA

In der Familie V-EDA-3 wurde der phänotypbasierte Genotypverdacht bestätigt. Dabei wurde eine neue Punktmutation in Exon 7 entdeckt. Es handelt sich um eine Substitution der zweiten Base eines Codons an der Position 866 G>A (CGC zu CAC) welches normalerweise für Arginin codiert. Durch diese Substitution entsteht Histidin statt Arginin an der Aminosäureposition 289 im Exon 7. Diese Mutation wird X-chromosomal vererbt. Betroffen waren neben den Patienten III:1 und III:2 die Probanden II:2, II:4, III:4 und III:5. Die Protein-Protein-Verbindung des EDA Proteins zu anderen Proteinen ist durch die Mutation gestört, da es zu Veränderungen an der Beta-Haarnadelstruktur kommt (s. Abb. II.4.24).

Das Ektodysplasie-A-Proteinmodell (s. Kapitel II.4, in Zusammenarbeit mit Dr. Wende) zeigt, dass die Mutation an Position p.289 die Protein-Protein-Interaktion beeinträchtigt oder sogar zerstört, während die inneren EDA-Trimer-Bindungen unverändert bleiben. Aufgrund dieser Tatsache kann die c.866 G>A-Mutation im EDA-Gen als pathologisch betrachtet werden.

In der Literatur wird eine Substitution der ersten Base dieses Codons beschrieben, welche zu der Substitution von Arginin zu Cystein führt (Arg289Cys, c.865C>T) (Song et al. 2009). Auch diese Mutation geht mit einer Oligodontie einher. Strukturell findet sich diese Mutation auf der äußeren Oberfläche des Homotrimers. Normalerweise geht Arginin eine Hydrogenbindung mit Asn 272, sowie eine Hydrogen- und eine elektrostatische Bindung mit Glu 308 (ein Teil des benachbarten Homotrimers) ein. Hierdurch wird die asymmetrische Multi-Trimer-Einheit stabilisiert (s. Abb. II.5.4). Die Mutation führt also zu einer Konformitätsänderung, welche die Stabilität des EDA Homotrimers potenziell beeinflussen kann (Song et al. 2009).

Die von Song et al. (2009) beschriebene Mutation betrifft das Codon, in dem sich auch die von uns gefundene neue Punktmutation befindet. Die Funktion des resultierenden Proteins scheint also durch Mutationen in diesem Bereich beeinflusst zu sein. Das Nichtanlagemuster des Probanden mit der Mutation Arg289Cys ähnelt dem der Probanden III:1 und III:2 unserer Studie (s. Abb. II.5.2 und II.5.3). Bei allen Probanden welche eine Mutation zeigten, waren sämtliche unteren Frontzähne nicht angelegt. Des Weiteren fehlten vielen dieser Probanden die oberen und unteren Eckzähne. Bei beiden Oligodontiepatienten mit der neuen EDA-Punktmutation sind ebenfalls alle

unteren Frontzähne und die oberen lateralen Inzisiven nicht angelegt. Dem Proband III:2 fehlen im Oberkiefer ebenfalls die Eckzähne.

EDA ist ein Typ II Transmembranprotein mit einer C-terminalen TNF Homologie-Domäne, welche ein Homotrimer zur Interaktion mit anderen Rezeptoren besitzt (Song et al. 2009). Mutationen der TNF-Domäne beeinflussen die Interaktion von EDA mit seinen Rezeptoren, mit dem Ectodysplasie-A Rezeptor (EDAR) und mit dem Ectodysplasie-A2 Rezeptor (EDA2R). Alle von Song et. al (2009) entdeckten Mutationen sind in der TNF-ähnlichen Domäne (Position 245-391) lokalisiert. Song et al. (2009) gehen davon aus, dass diese Mutationen die Interaktionen von EDA mit seinen Rezeptoren beeinflussen. Neben der Mutation Arg289Cys beschreibt Song zwei weitere Mutationen: p.Ala259Glu und p.Arg334His. Die im Vorfeld auch durch andere Autoren beschriebenen Mutationen p.Gly255Cys, p.Gly291Arg und p.Cys332Tyr befinden sich in nahezu unmittelbarer Nachbarschaft zu den von Song identifizierten Mutationen (p.Ala259Glu, p.Arg289Cys und pArg334His).

Die von uns gefundene Mutation (p.Arg289His) befindet sich ein Basenpaar hinter der Mutation p.Arg289Cys und verhindert ebenfalls die Synthese von Arginin. Song et al. (2009) beschreiben, dass die Mutation an der Position 289 zu einer Veränderung auf der Proteinoberfläche führt, entfernt von der aktiven Seite Glu 308. Sie gehen davon aus, dass lediglich die Stabilität des Homotrimers sowie ein Teil der Funktion des EDA-Proteins beeinflusst werden.

Yang et al. (2013) untersuchten das EDA Gen in einer chinesischen Familie mit vier oligodonten Patienten. Sie stellten eine bisher noch nicht beschriebene Mutation heraus: c.779T>G. Diese resultiert in der Substitution von Serin anstelle von Isoleucin an der Position 206 (p.Ile206Ser). Sie befindet sich in der Nähe der von uns gefundenen Punktmutation, ebenso in der Nähe der von Song et al. 2009 beschriebenen Mutationen. Weiter analysierten Yang et al. (2013) die Unterschiede zwischen den Mutationen, die zu XLHED, der x-chromosomal vererbten hypohidrotischen ektodermalen Dysplasie führen und den Mutationen, die in Nichtanlagen von Zähnen resultieren. Sie erkannten hierbei, dass Mutationen für XLHED zu 60% auf der TNF Homologie Domäne lokalisiert sind, wohingegen sich sogar 80% der Hypodontie verursachenden Mutationen auf der gleichen Domäne befinden. Weiter untersuchten Yang et al. (2013) die Lokalisation der Mutation und stellten fest, dass sich Hypodontie verursachende Mutationen zum größten Teil auf der Außenseite der TNF-Homologie-Domäne finden; Mutationen, welche zur

hypohidrotischen ektodermalen Dysplasie führen, sind in der Regel im Inneren dieser Domäne lokalisiert. Yang et al. (2013) stellen die Theorie auf, dass Mutationen auf der Außenseite die Proteinfunktion weniger beeinflussen als solche, die sich im Inneren der Domäne befinden. Daher können Mutationen auf der Außenseite zu leichten ektodermalen Phänotypen führen, so zum Beispiel zu Nichtanlagen. Dies erklärt, warum die von uns gefundene Mutation nicht zu einem syndromalen Phänotyp führt.

Lee et al. (2014) berichten von einer neu entdeckten Mutation (c.866G>T (p.R289L)). Es handelt sich um eine Familie mit Oligodontie sowie anormal gelocktem Haar bei den betroffenen männlichen Probanden. Die Substitution von Arginin durch Histidin an Position 289 scheint einen stärkeren Effekt auf die phänotypischen Symptome der ektodermalen Anomalien zu haben. Die beiden betroffenen Patienten unserer Untersuchung zeigen Areale hypopigmentierter Haut, eine Hypotrichose und eine abnorme Form des Ohres.

Nikopensius et al. (2013) untersuchten eine estländische Familie, in welcher eine unterschiedliche Expressivität und damit ein anderer Ausprägungsgrad des Phänotyps bei gleichbleibendem Genotyp bezüglich der Nichtanlagen zu finden war. Sie fanden eine weitere Mutation (c.874G>T / p.Glu292X) in der TNF-Homologie-Domäne des EDA-Gens. Durch ein unterschiedliches Inaktivierungsmuster wird das EDA-Rezeptor-Signal in den in die Odontogenese involvierten Geweben unterschiedlich stark reduziert.

Plaisancié et al. (2013) beschreiben Patienten mit ektodermaler Dysplasie, welche EDAR- und WNT10A-Mutationen aufweisen. Sie analysierten die Gene EDA, EDAR und WNT10A bei 36 Patienten mit ektodermaler Dysplasie. Auffällig war, dass bei keinem Probanden eine EDA-Mutation, aber bei 14% der Probanden EDAR-Mutationen und bei sogar 44% WNT10A-Mutationen gefunden wurden. Bei 42% der Probanden konnte keine Mutation nachgewiesen werden. Die Versuchspersonen mit nachgewiesener WNT10A-Mutation zeigten alle nur geringe ektodermale Merkmale, kennzeichnend waren bei ihnen die Nichtanlagen. 90% der Probanden waren oligodont. Es scheinen aber Zusammenhänge zwischen WNT10A-Mutationen und der ektodermalen Dysplasie zu existieren. Dies ist wiederum im Schaubild der kraniofazialen Signalwege nachvollziehbar (s. Abb. II.5.5). Markant ist der hohe Anteil der WNT10A-Mutationen. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Frage nach WNT10A-Mutationen auch für Probanden mit nicht-syndromaler Oligodontie.

Insgesamt sind in der Literatur zehn verschiedene EDA-Mutationen beschrieben (s. Teil I). In Abb. II.5.1 sind diese Mutationen und ihre jeweilige Lokalisation dargestellt. Hinzugefügt wurde die neue Punktmutation R289H.

Nieminen et al. (2007) führte in weiteren Studien eine genomweite Analyse durch. Hierbei stellten sie fest, dass es keinen Hauptlokus für bestimmte Nichtanlagemuster gibt. Die Analyse zeigte vielmehr eine Existenz zahlreicher Loci, welche bereits bekannte Kandidatengene beinhalten könnten. Besonders auffällig war Chromosom 18.

Betrachtet man die vielen Zusammenhänge des komplizierten Prozesses „Zahnentwicklung“, so findet sich ein weiterer Diskussionsaspekt: Der Zahnkeim setzt sich aus den Komponenten Schmelzorgan, Zahnpapille und Zahnsäckchen zusammen. Aus dem Epithel wächst die Zahnleiste in das Mesenchym, diese bildet Schmelzknospen, welche sich zu Schmelzkappen und weiter zu Schmelzglocken entwickeln. Die Schmelzglocke hat ein inneres und ein äußeres Schmelzepithel. Die Präameloblasten entstehen aus den Zellen des inneren Schmelzepithels und regulieren durch ihre Anordnung die spätere Zahnform. Es kommt zur Zelldifferenzierung: In der Einziehung der Schmelzglocke entwickelt sich die Zahnpapille. Mesenchymzellen grenzen an die Basallamina am inneren Schmelzepithel und entwickeln sich zu Präodontoblasten. Die Basallamina leitet die Odontoblastendifferenzierung ein, es wird Prädentin gebildet. Hierdurch werden die Ameloblasten im inneren Schmelzepithel aktiviert. Sobald mineralisiertes Dentin vorliegt beginnt die Schmelzsekretion. Inneres und äußeres Schmelzepithel wachsen als Hertwigsche Epithelscheide nach apikal und bilden die Wurzel. Hierdurch differenzieren sich Odontoblasten zur Wurzeldentinbildung in der Papille. Die Epithelscheide löst sich auf, die Mesenchymzellen des Zahnsäckchens werden so zur Bildung von Zement angeregt (Lüllmann-Rauch, 2003).

Dieser Prozess wird durch eine komplexe Serie von genetischen Interaktionen, welche die Signalwege manipulieren, kontrolliert (Nieminen, 2007). Es wird vermutet, dass neben Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFs) Wingless (WNTs) und Ectodysplasin-A (EDA) die erste Formation aktivieren (Mustonen et al., 2004; Nieminen, 2007). Die durch WNT induzierte Aktivierung des Beta-Catenin Signalweges ist für die Bildung der Zahnstrukturen notwendig. Es wurde gezeigt, dass die FGF4-Expression im Schmelzorgan und ebenso die EDA-Expression im Epithel WNT abhängig sind (Kratochwil et al. 2002; Laurikkala et al. 2001; Mikkola et al. 1999). Eine steigende EDA-Synthese aktiviert die Sonic Hedgehog (SHH) Expression sowie die Inhibition der

Aktivität von Bone Morphogenetic Proteinen (BMPs). Diese Prozesse ermöglichen eine korrekte Zahnbildung (Pummila et al. 2007).

Neben den verschiedenen WNTs, welche während der Zahnbildung exprimiert werden, spielt WNT10A eine Schlüsselrolle bei der Odontoblastendifferenzierung und in der Zahnbildung (He et al. 2013; Yamashiro et al. 2007). In vitro Studien haben gezeigt, dass die verminderte Expression von WNT10A die Odontogenese und die mesenchymale Zellproliferation beeinflusst (Liu et al. 2013). Die Bedeutung von WNT10A zeigt sich in vielen aktuellen Studien: Bei mehr als 50% der Fälle von isolierten Nichtanlagen liegt eine Mutation des WNT10A Gens vor (van den Boogaard et al. 2012).

Ähnlich verhält es sich mit dem EDA-EDAR Signalweg: Dieser spielt eine zentrale Rolle während der Organogenese. Die Expression des EDA Rezeptors (EDAR) findet während der frühen Stadien der Zahnentwicklung statt und bleibt bis zur Formation der Höckerspitzen bestehen (Pispa et al. 2004). Die EDA und EDAR Expression finden im primären Ektoderm statt (Tucker et al. 2000). Nach der Bildung des Zahnsäckchens wird EDAR exprimiert. EDA hingegen zeigt eine komplementäre Expression. Später kann EDAR in ektodermalen Signalzentren nachgewiesen werden (Laurikkala et al. 2001).

Bis heute wurden keine nachgewiesenen Zusammenhänge zwischen Typ sowie Lokalisation der Genmutation und dem Schweregrad des hiermit zusammenhängenden Phänotyps gefunden (Anzahl und Position der fehlenden Zähne) (Mues et al. 2010; van Wijk and Tan 2006).

Weitere Funktionsanalysen und eine Charakterisierung der hier beschriebenen Novelmutation sind notwendig um ihre Relevanz im Detail aufzuklären.

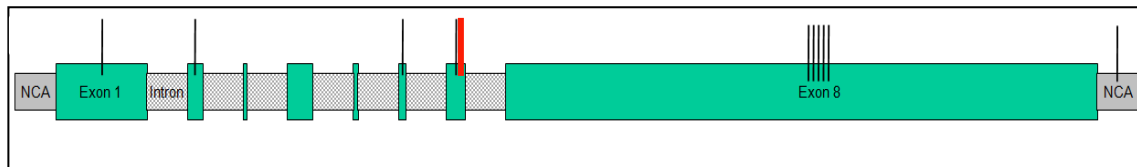


Abb. II.5.1: Alle in Teil I dargestellten Mutationen des EDA-Gens, welche in Zusammenhang mit non-syndromalen Oligodontien herausgearbeitet wurden. Die neue Punktmutation auf Exon 7 ist rot dargestellt. (NCA: non-coding area) (Bock et al. 2013)

7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC	Summe
	X	X	X	X				X	X	X	X			30	30
	X	X	X	X	X					X	X			31	24
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7		=115

PROBAND3

Abb. II.5.2: FDI-Schema des Probanden 3 (Song et al. 2009).

7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC	Summe
					X			X						2	2
				X	X			X	X					3	3
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7		=10

PROBANDIII:1

7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC	Summe
			X	X	X			X	X	X				14	14
	X					X		X	X		X			19	19
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7		=66

PROBANDIII:2

Abb.II.5.3: FDI-Schemata der Probanden III:1 und III:2 der Familie V-EDA-3.

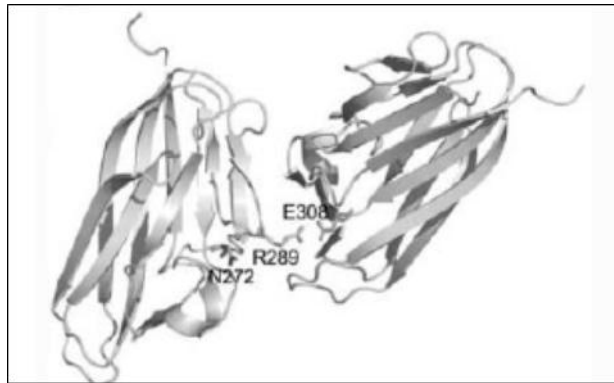


Abb.II.5.4: Arg 289 bildet mit Asn 272 eine Hydrogenbindung und mit Glu 308 des benachbarten Homotrimers eine Hydrogen- sowie eine elektrostatische Bindung (Song 2009). Hierdurch kommt es zu einer Veränderung der Protein-Protein-Interaktion.

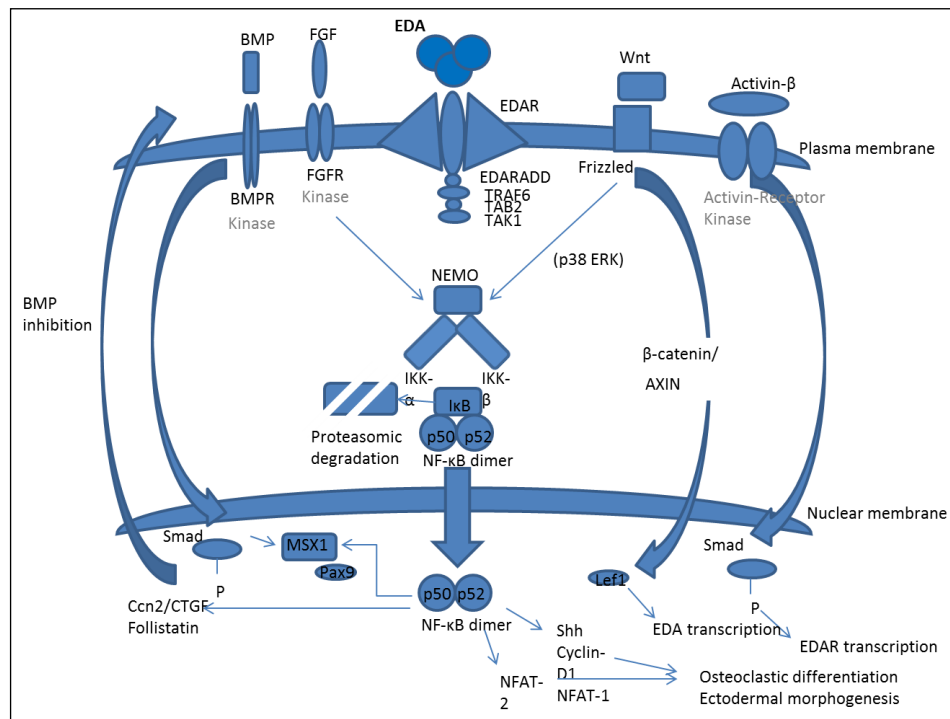


Abb.II.5.5: Interaktion kraniofazialer Signalwege.

2 Zusammenfassungen/Summaries

2 Zusammenfassungen/Summaries

2.1 Zusammenfassung Teil I

Ziel: Ziel der vorliegenden Studie war die Identifizierung aller bekannten Genmutationen, die mit der Entstehung nonsyndromaler Oligodontien assoziiert werden.

Material und Methode: Eine systematische elektronische Literatursuche bis einschließlich Januar 2013 wurde in zwei Datenbanken (PubMed, Medpilot) durchgeführt und durch eine Handsuche ergänzt. Folgende Suchbegriff-Kombinationen wurden verwendet: *oligodontia* and *genes*, *oligodontia* and *mutations*, *tooth agenesis* and *genes*, *tooth agenesis* and *mutations*. Auf der Grundlage des Tooth Agenesis Codes (TAC) wurde eine Metaanalyse der Daten durchgeführt.

Nach Akzeptanz des zuvor abgedruckten Artikels (Ruf et al. 2013) bzw. nach Ende des Inklusionszeitraumes für diese Publikation, sind in der Literatur neue Studien erschienen, die Mutationen im WNT10A-Gen für die Entstehung von Oligodontien verantwortlich machen. Um die entsprechenden Daten der WNT10A Mutationen mit den Daten der vorliegenden Publikation vergleichen zu können, wurden auf alle mittels einer einfachen elektronischen Literaturrecherche identifizierten Artikel zu WNT10A und Hypo- bzw. Oligodontien, die bestehenden Einschluss- bzw. Ausschlusskriterien angewandt.

Ergebnisse: Zwischen den sieben bisher bekannten Genen, die nonsyndromale Oligodontien verursachen können, variiert sowohl die Anzahl der identifizierten Mutationen (M) je Gen als auch die Anzahl der in der Literatur beschriebenen Patienten (P): PAX9 (33 M, 93 P), EDA (10 M, 51 P), MSX1 (12 M, 33 P), AXIN2 (6 M, 17 P), EDARADD, NEMO und KRT17 (je 1M, 1P). Der TAC-Summenwert 250 besaß Trennwerteigenschaften: $TAC \leq 250$ (100% MSX1- und 80% EDA-Patienten); $TAC > 250$ (96,9% PAX9- und 90% AXIN2-Patienten). Des Weiteren fand sich ein ungerader TAC-Wert in mindestens in einem Quadranten bei 94,3% der EDA-Patienten, aber nur

bei 28,6% der MSX1-Patienten. Ein TAC-Wert von 112 in mindestens in einem Quadranten trat bei 72,7% der PAX9-, jedoch bei keinem der AXIN2-Patienten auf.

Den Ein- bzw. Ausschlusskriterien entsprachen auf Ebene des „Systematic Reviews“ zwei WNT10A Artikel, diese beschreiben zehn verschiedene WNT10A-Mutationen und insgesamt 39 oligodonte Patienten. Keine bisher publizierte WNT10A-Studie erfüllte die Einschlusskriterien der „Metaanalyse“.

Schlussfolgerung: Bisher waren sieben Gene bekannt, die nonsyndromale Oligodontien verursachen können, dies sind in abnehmender Häufigkeit: PAX9, EDA, MSX1, AXIN2, EDARADD, NEMO und KRT17. Hinzu kommt das Gen WNT10A, bei welchem Mutationen non-syndromale Oligodontien verursachen können. Auf der Basis des Tooth Agenesis Codes (TAC) war innerhalb des Patientengutes der Metaanalyse ein Zusammenhang zwischen Oligodontie-Phänotyp und Genotyp darstellbar. Die Studien, welche WNT10A-Mutationen im Zusammenhang mit Oligodontien untersuchen, erfüllen nicht die Einschlusskriterien der Metaanalyse.

2.2 Summary Part I

Objectives: The goal of this work was to identify all known gene mutations that have been associated with the development of non-syndromic oligodontia.

Material and Methods: A systematic literature search was performed electronically in two databases (PubMed, Medpilot) supplemented by a hand search. Articles published up to January 2013 were considered. Search terms were combined as follows: *oligodontia* and *genes*, *oligodontia* and *mutations*, *tooth agenesis* and *genes*, *tooth agenesis* and *mutations*. A meta-analysis of the data was conducted based on the Tooth Agenesis Code (TAC).

After permission of the article (Ruf et al. 2013) new studies were published, which give further evidence for an association between WNT10A and oligodontia. To compare the current data of the WNT10A mutations with the data of the published studies, we used the inclusion criteria to select the studies. The studies were found by conducting a systematic literature review.

Results: Seven genes are currently known to have a potential for causing non-syndromic oligodontia. All these genes vary both in terms of number of identified mutations and in terms of number of documented patients: 33 mutations and 93 patients are on record for PAX9, 10 mutations and 51 patients for EDA, 12 mutations and 33 patients for MSX1, 6 mutations and 17 patients for AXIN2, and 1 mutation in 1 patient for EDARADD, NEMO and KRT17 each. A total TAC score of 250 was found to have cutoff properties, as 100% of MSX1 and 80% of EDA patients exhibited TAC \leq 250, whereas 96.9% of PAX9 and 90% of AXIN2 patients but only 28.6% of MSX1 patients exhibited odd-numbered TAC scores in at least one quadrant, and 72.7% of PAX9. But none of the AXIN2 patients were found to show TAC scores of 112 in at least one quadrant.

Two WNT10A articles were in accordance with the inclusion criteria and could be included in the systematic review. These articles describe 10 different WNT10A mutations and 39 patients. None of the currently published studies fulfilled the inclusion criteria for the meta-analysis.

Conclusion: In order of decreasing frequency, PAX9, EDA, MSX1, AXIN2, EDARADD, NEMO and KRT are the seven genes currently known to have a potential for causing

non-syndromic oligodontia. In literature also WNT10A mutations have been described for causing oligodontia. TAC scores enabled us to identify an association between oligodontia phenotypes and genotypes in the patients covered by this meta-analysis. The studies describing WNT10A mutations did not fulfill the inclusion criteria of the meta-analysis.

2.3 Zusammenfassung Teil II

Ziel: Ziel der vorliegenden Studie war die Verifizierung, ob sich der in Teil I geäußerte Verdacht einer Assoziation von Genotyp und Phänotyp bei non-syndromalen Oligodontien in einem unselektierten Oligodontiepatientengut bestätigen lässt. Es wurde analysiert, ob eine TAC basierte Prognose des Genotyps möglich ist.

Material und Methode: In der Poliklinik für Kieferorthopädie des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen behandelte Patienten (von Januar 1986 bis April 2013) mit non-syndromalen Oligodontien wurden kontaktiert. Einschlusskriterien waren das Vorliegen einer nicht-syndromalen Oligodontie, die Nichtanlagen mussten durch Orthopantomogramm (OPG) oder FDI-Zahnschema verifizierbar sein und es musste mindestens ein weiterer hypo-/oligodonter Fall in der Familie vorliegen. Familienmitglieder wurden bezüglich vorliegender Hypo- oder Oligodontien befragt.

Zur Auswertung und zum Vergleich genspezifischer Phänotypen der Probanden wurden nach Erhebung des Zahnstatus gemäß FDI-Zahnschema die Nichtanlagedaten der eingeschlossenen oligodonten Probanden analysiert. Dies geschah mit Hilfe des Tooth Agenesis Codes (TAC) (van Wijk et al. 2006) (s. Abb. I.2.1), anhand dessen eine Genotypprognose gestellt wurde (gemäß der Abb. 4 und 5, S. 177). Mutationen auf den Genen MSX1, EDA und AXIN2 wurden evaluiert. Die Gendiagnostik erfolgte durch Analyse von Speichelproben der Patienten/Probanden im Labor und wurde durch spezifisch geschultes Fachpersonal durchgeführt. Bei positivem Untersuchungsergebnis wurden alle verfügbaren Familienmitglieder genetisch untersucht. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit korrespondierenden Einträgen der NCBI Genbank sowie von Ensembl verglichen.

Es wurden jeweils folgende Exons sowie die Exon begrenzenden Bereiche analysiert: MSX1: Exon 1, Exon 2; EDA: Exon 1-8; AXIN2: Exon 8, Exon 9.

Ergebnisse: Nach Durchsicht der Patientenakten, Beachtung der Einschlusskriterien sowie Kontaktaufnahme nahmen 20 Patienten teil. Diese zeigten auf der Grundlage ihrer TAC-Codes bzw. ihrer TAC-Summen folgende Mutationsvermutung: Bei elf

Patienten bestand MSX1-Verdacht, drei Patienten ließen einen AXIN2-Verdacht zu und bei sechs Patienten konnte ein EDA-Verdacht gestellt werden.

Die Untersuchung des MSX1-Gens ergab bei zwei Probanden eine 3'UTR Variante auf Exon 2, diese zeigten zusätzlich eine heterozygote Missense-Variante der Aminosäuresequenz an Position 40 des Exon 1. Isoliert wurde diese Missense-Variante auch bei zwei weiteren Probanden gefunden. Beide Varianten führen zu keiner funktionellen Mutation und sind daher (lt. Ensembl) nicht pathologisch. Der Single Nucleotid Polymorphismus (SNP) in Form einer 3'UTR Variante im Exon 2 des MSX1 Gens führt zu einer Substitution von T zu C an Stelle 864876. Die Missense Variante der Aminosäuresequenz an Position 40 des Exon 1 resultiert in der Bildung von Glycin statt Alanin an Aminosäureposition 40.

Die Analyse des EDA-Gens zeigte folgende Ergebnisse: Die Untersuchung der fünf Familien mit Verdacht auf EDA-Mutation ergab eine neue Punktmutation. Zwei Patienten derselben Familie zeigten eine Genmutation in Exon 7 des EDA-Gens, welche anschließend auch bei Familienangehörigen gefunden wurde. Es handelt sich um eine Substitution, durch welche an Aminosäureposition 289 Histidin statt Arginin entsteht. Keine der drei Familien mit der Verdachtsdiagnose AXIN2 zeigte Mutationen des Gens AXIN2.

Schlussfolgerung: Der auf der Grundlage der Literatur (Teil I) vermutete Zusammenhang zwischen Oligodontiephänotyp und -genotyp konnte in dem vorliegenden weitestgehend unselektierten Oligodontie-Patientengut nicht bestätigt werden, da eine phänotypbasierte Genotypprognose nur in 33,3% der EDA-Verdachtspatienten und 10% der Oligodontiepatienten erfolgreich war.

2.4 Summary Part II

Objectives: The aim of this study was to verify the hypothesis if a genotype-phenotype association of non-syndromic oligodontia in a cohort of unselected patients with non-syndromic oligodontia exists. We analyzed if there is a possibility to forecast a TAC based prognosis of the genotype.

Material and Methods: All non-syndromic oligodontia patients who were treated in the Department of Orthodontics, Medical Center for Dental and Oral Medicine, Justus-Liebig-Universität Gießen, Germany, between January 1986 and April 2013 were contacted. The inclusion criteria for the study were: The existence of a non-syndromic oligodontia. The tooth agenesis had to be proven using an orthopantomogram (OPG) or a FDI notation. At least one family member had to be suffering from hypo- or oligodontia. Family members were asked if they were affected by a hypodontia or an oligodontia, too.

After assessing the dental status according to the FDI notation the data regarding the tooth agenesis of each proband suffering from oligodontia was analyzed.

Using the Tooth Agenesis Code (TAC) (van Wijk et al. 2006) (Fig. I.2.1, Part I), we forecasted a prognosis of a possible genotype (Fig. 4 and 5, S. 177). Gene mutations of the genes MSX1, EDA und AXIN2 were evaluated. Diagnostics of the genes were carried out with saliva samples of the patients/probands. The diagnostic was conducted in a laboratory by a qualified person. In the case of positive results of investigation all available family members were examined genetically. The outcomes of the sequencing were compared with correspondent data set entries of the NCBI Gene Database. The following exons and the exon/intron boundaries were analyzed: MSX1: Exon 1, Exon 2; EDA: Exon 1-11; AXIN2: Exon 8, Exon 9.

Results: After checking the health records and considering the inclusion criteria as well as contacting all possible patients 20 patients finally participated in the study. Based on their TAC-Codes respectively their TAC-Sums it was assumed that they might be carriers of the following mutations: 11 patients were suspected to have a MSX1-

suspicion, 3 patients seemed to have an AXIN2-suspicion and 6 patients were thought to have an EDA-suspicion.

The examination of the MSX1-gene showed in two cases a 3'UTR variant on exon 2, these two probands had an additional heterozygous missense-variant of the amino acid sequence at position 40 of exon 1. Two other probands had also this heterozygous missense-variant without any other mutation. Both variants do not lead to a functional mutation, so they are not pathologic (<http://www.ensembl.org/index.html>). The Single Nucleotide Polymorphism (SNP) described as a 3'UTR variant in exon 2 of the MSX1 gene leads to a substitution of T to C at the position 864876. The missense variant of the amino acid sequence at position 40 of exon 1 results in an appearance of glycine instead of alanine at the amino acid position 40.

The analysis of the EDA-gene showed the following results: The gene-sequencing of the five families suspected to have an EDA-mutation revealed an EDA missense mutation involving a G>A transition at c.866. This substitution results in a change from arginine (CGC) to histidine (CAG) at the amino acid position p.289 on exon 7. Two patients out of one family had a mutation. The described mutation was also found in family members. None of the three families suspected to have AXIN2 mutations carried a mutation in the AXIN2 gene.

Conclusion: The assumed correlation between the geno- and the phenotype of a non-syndromic oligodontia in a mostly unselected group of patients could not be verified, because a phenotype based genotype prognosis showed less success: in 33,3% of the potential EDA patients and in 10% of the patients suffering from oligodontia the prognosis was correct.

3 Literaturverzeichnis

Al-Emran S. Prevalence of hypodontia and developmental malformation of permanent teeth in Saudi Arabian schoolchildren. *Br J Orthod.* 1990;17(2):115-8.

Arcuri C, Zito I, Santini F, Muzzi F, Panetta V, Squitti R. Understanding the implications of the PAX9 gene in tooth development. *Eur J Paediatr Dent.* 2011;12(4):245-8.

Arte S, Nieminen P, Apajalahti S, Haavikko K, Thesleff I, Pirinen S. Characteristics of incisor-premolar hypodontia in families. *J Dent Res.* 2001;80(5):1445-50.

Arte S, Parmanen S, Pirinen S, Alaluusua S, Nieminen P. Candidate Gene Analysis of Tooth Agenesis Identifies Novel Mutations in Six Genes and Suggests Significant Role for WNT and EDA Signaling and Allele Combinations. *PLoS One.* 2013 22;8(8):e73705.

Arzoo PS, Klar J, Bergendal B, Norderyd J, Dahl N. WNT10A mutations account for ¼ of population-based isolated oligodontia and show phenotypic correlations. *Am J Med Genet A.* 2014;164A(2):353-9.

Ayub M, Ur-Rehman F, Yasinzaï M, Ahmad W. A novel missense mutation in the ectodysplasin-A (EDA) gene underlies X-linked recessive nonsyndromic hypodontia. *Int J Derma* 2010;49:1399–1402.

Bartzela TN, Carels CE, Bronkhorst EM, Kuijpers-Jagtman AM. Tooth agenesis patterns in unilateral cleft lip and palate in humans. *Arch Oral Biol.* 2013;58(6):596-602.

Behr M, Proff P. Survey of congenitally missing teeth in orthodontic patients in Eastern Bavaria. *Eur J Orthod.* 2011;33(1):32-6.

Bergendal B. Oligodontia ectodermal dysplasia-on signs, symptoms, genetics, and outcomes of dental treatment. *Swed Dent J Suppl.* 2010;(205):13-78, 7-8.

Bergendal B, Klar J, Stecksén-Blicks C, Norderyd J, Dahl N. Isolated oligodontia associated with mutations in EDARADD, AXIN2, MSX1, and PAX 9 genes. *Am J Med Genet* 2011;155A:1616-1622.

Bock N, Jabir S, Ruiz-Heiland G, Ruf S. Non-syndromic oligodontia (NSO) – a risk marker for cancer? Poster *Moyers Symposium* 2013.

Bodine PV, Komm BS. Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2006;7(1-2):33-9.

Boeira Junior BR, Echeverrigaray S. Novel missense mutation in PAX9 gene associated with familial tooth agenesis. *J Oral Path.* 2013;42(1):99-105.

Bohring A, Stamm T. WNT10A mutations are a frequent cause of a broad spectrum of ectodermal dysplasias with sex-biased manifestation pattern in heterozygotes. *Am J Hum Genet.* 2009;85(1):97-105.

Butali A, Mossey PA, Adeyemo WL, Jezewski PA, Onwuamah CK, Ogunlewe MO, Ugboko VI, Adejuyigbe O, Adigun AI, Abdur-Rahman LO, Onah II, Audu RA, Idigbe EO, Mansilla MA, Dragan EA, Petrin AL, Bullard SA, Uduezue AO, Akpata O, Osaguona AO, Olasoji HO, Ligali TO, Kejeh BM, Iseh KR, Olaitan PB, Adebola AR, Efunkoya E, Adesina OA, Oluwatosin OM, Murray JC; NigeriaCRAN Collaboration. Genetic studies in the Nigerian population implicate an MSX1 mutation in complex oral facial clefting disorders. *Cleft Palate Craniofac J.* 2011;48(6):646-53.

Callahan N, Modesto A, Meira R, Seymen F, Patir A, Vieira AR. Axis inhibition protein 2 (AXIN2) polymorphisms and tooth agenesis. *Arch Oral Biol.* 2009;54(1):45-9.

Celikoglu M, Kazanci F, Miloglu O, Oztek O, Kamak H, Ceylan I. Frequency and characteristics of tooth agenesis among an orthodontic patient population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010;15(5):e797-801.

Chalothorn LA, Beeman CS, Ebersole JL, Kluemper GT, Hicks EP, Kryscio RJ, DeSimone CP, Modesitt SC. Hypodontia as a risk marker for epithelial ovarian cancer: a case-controlled study. *J Am Dent Assoc.* 2008;139(2):163-9.

Chishti MS, Muhammad D, Haider M, Wasim A. A novel missense mutation in MSX1 underlies autosomal recessive oligodontia with associated dental anomalies in Pakistani families. *J Hum Genet* 2006;51:872–878.

Das P, Stockton DW, Bauer C, Shaffer LG, D'Souza RN, Wright T, Patel PI. Haploinsufficiency of PAX9 is associated with autosomal dominant hypodontia. *Hum Genet* 2002;110:371–376

Das P, Hai M, Elcock C, Leal SM, Brown DT, Brook AH, Patel PI. Novel missense mutations and a 288-bp exonic insertion in PAX9 in families with autosomal dominant hypodontia. *Am J Med Genet* 2003;118A:35–42.

Davis PJ. Hypodontia and hyperdontia of permanent teeth in Hong Kong schoolchildren. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1987;15(4):218-20.

De Muyneck S, Schollen E, Matthijs G, Verdonck A, Devriendt K, Carels C. A novel MSX1 mutation in hypodontia. *Am J Med Genet* 2004;128A:401–403.

Diedrich P, Praxis der Zahnheilkunde: Kieferorthopädie I. *Urban&Fischer*; 2000.

Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2011;12(3):167-78.

Fan H, Ye X, Shi L, Yin W, Hua B, Song G, Shi B, Bian Z. Mutations in the EDA gene are responsible for X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia and hypodontia in Chinese kindreds. *Eur J Oral Sci.* 2008;116(5):412-7.

Frazier-Bowers SA, Guo DC, Cavender A, Xue L, Evans B, King T, Milewicz D, D'Souza RN. A novel mutation in human PAX9 causes molar oligodontia. *J Dent Res*. 2002;81(2):129-33.

Gerits A, Nieminen P, De Muynck S, Carels C. Exclusion of coding region mutations in MSX1, PAX9 and AXIN2 in eight patients with severe oligodontia phenotype. *Orthod Craniofac Res*. 2006;9(3):129-36.

Gomes RR, da Fonseca JA, Paula LM, Faber J, Acevedo AC. Prevalence of hypodontia in orthodontic patients in Brasilia, Brazil. *Eur J Orthod*. 2010;32(3):302-6.

Gungor AY, Turkkahraman H. Effects of severity and location of nonsyndromic hypodontia on craniofacial morphology. *Angle Orthod*. 2013;83(4):584-90.

Han D, Gong Y, Wu H, Zhang X, Yan M, Wang X, Qu H, Feng H, Song S. Novel EDA mutation resulting in X-linked nonsyndromic hypodontia and the pattern of EDA-associated isolated tooth agenesis. *Eur J Med Genet* 2008;51:536–546.

Hansen L, Kreiborg S, Jarlov H, Niebuhr E, Eiberg H. A novel nonsense mutation in PAX9 is associated with marked variability in number of missing teeth. *Eur J Oral Sci* 2007;115:330–333.

He H, Han D, Feng H, Qu H, Song S, Bai B, Zhang Z. Involvement of and interaction between WNT10A and EDA mutations in tooth agenesis cases in the Chinese population. *PloS one* 2013;8(11):e80393.

Ichikawa E, Watanabe A, Nakano Y, Akita S, Hirano A, Kinoshita A, Kondo S, Kishino T, Uchiyama T, Niikawa N, Yoshiura K. PAX9 and TGFB3 are linked to susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Japanese: population-based and family-based candidate gene analyses. *J Hum Genet*. 2006;51(1):38-46.

Järvinen S, Lehtinen L. Supernumerary and congenitally missing primary teeth in Finnish children. An epidemiologic study. *Acta Odontol Scand*. 1981;39(2):83-6.

Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE, Daack-Hirsch S, Schultz RE, Weber A, Nepomucena B, Romitti PA, Christensen K, Orioli IM, Castilla EE, Machida J, Natsume N, Murray JC. Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet*. 2003;40(6):399-407.

Jumlongras D, Lin JY, Chapra A, Seidman CE, Seidman JG, Maas RL, Olsen BR. A novel missense mutation in the paired domain of PAX9 causes non-syndromic oligodontia. *Hum Genet*. 2004 Feb;114(3):242-9.

Jussila M, Thesleff I. Signaling Networks Regulating Tooth Organogenesis and Regeneration, and the Specification of Dental Mesenchymal and Epithelial Cell Lineages. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4(4):a008425.

Kapadia H, Frazier-Bowers S, Ogawa T, D'Souza RN. Molecular characterization of a novel PAX9 missense mutation causing posterior tooth agenesis. *Eur J Hum Genet*. 2006;14(4):403-9.

Kendall J, Liu Q, Bakleh A, Krasnitz A, Nguyen KC, Lakshmi B, Gerald WL, Powers S, Mu D. Oncogenic cooperation and coamplification of developmental transcription factor genes in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(42).

Kere J, Srivastava AK, Montonen O, Zonana J, Thomas N, Ferguson B, Munoz F, Morgan D, Clarke A, Baybayan P, Chen EY, Ezer S, Saarialho-Kere U, de la Chapelle A, Schlessinger D. X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. *Nat Genet* 1996; 13: 409-416.

Khabour OF, Mesmar FS, Al-Tamimi F, Al-Batayneh OB, Owais AI. Missense mutation of the EDA gene in a Jordanian family with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia: phenotypic appearance and speech problems. *Genet Mol Res.* 2010;9(2):941-8.

Kim JW, Simmer JP, Lin BP, Hu JC. Novel MSX1 frameshift causes autosomal-dominant oligodontia. *J Dent Res.* 2006;85(3):267-71.

Kjaer I, Kocsis G, Nodal M, Christensen LR. Aetiological aspects of mandibular tooth agenesis--focusing on the role of nerve, oral mucosa, and supporting tissues. *Eur J Orthod.* 1994;5:371-5.

Kjaer I, Keeling J, Fischer-Hansen B. The Prenatal Human Cranium – normal and pathologic development. *Munksgaard*, Copenhagen, 1999.

Kjaer I, Nielsen MH, Skovgaard LT.. Can persistence of primary molars be predicted in subjects with multiple tooth agenesis? *Eur J Orthod.* 2008;30(3):249-53.

Klein ML, Nieminen P, Lammi L, Niebuhr E, Kreiborg S. Novel mutation of the initiation codon of PAX9 causes oligodontia. *J Dent Res.* 2005;84(1):43-7.

Kratochwil K, Galceran J, Tontsch S, Roth W, Grosschedl R. FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in Lef1 (-/-) mice. *Genes & development* 2002;16(24):3173-3185.

Lammi L, Halonen K, Pirinen S, Thesleff I, Arte S, Nieminen P. A missense mutation in PAX9 in a family with distinct phenotype of oligodontia. *Eur J Hum Genet.* 2003;11(11):866-71.

Lammi L, Arte S, Somer M, Jarvinen H, Lahermo P, Thesleff I, Pirinen S, Nieminen P. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet* 2004;74:1043-1050.

Lapter M, Slaj M Inheritance of hypodontia in twins. *Coll Antropol.* 1998;22(1):291-8.

Laurikkala J, Mikkola M, Mustonen T, Aberg T, Koppinen P, Pispä J, Nieminen P, Galceran J, Grosschedl R, Thesleff I. TNF signaling via the ligand-receptor pair ectodysplasin and edar controls the function of epithelial signaling centers and is regulated by Wnt and activin during tooth organogenesis. *Developmental biology* 2001;229(2):443-455.

Lee KE, Ko J, Shin TJ, Hyun HK, Lee SH, Kim JW. Oligodontia and curly hair occur with ectodysplasin-a mutations. *J Dent Res.* 2014;93(4):371-5.

Li WL, Cui JJ, Fang QY, Mei LX. A novel mutation of MSX1 gene in a Chinese pedigree with oligodontia. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2008;43:157–159.

Liang J, Song G, Li Q, Bian Z. Novel missense mutations in PAX9 causing oligodontia. *Arch Oral Biol.* 2012;57(6):784-9.

Liang J, Zhu L, Meng L, Chen D, Bian Z. Novel nonsense mutation in MSX1 causes tooth agenesis with cleft lip in a Chinese family. *Eur J Oral Sci.* 2012;120(4):278-82.

Lidral AC, Reising BC. The Role of MSX1 in human tooth agenesis. *J Dent Res* 2008;81(4):274–278.

Liu W, Sun X, Braut A, Mishina Y, Behringer RR, Mina M, Martin JF. Distinct functions for Bmp signaling in lip and palate fusion in mice. *Development.* 2005;132(6):1453-61.

Liu Y, Han D, Wang L, Feng H. Down-regulation of Wnt10a affects odontogenesis and proliferation in mesenchymal cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2013;434(4):717-721.

Löffler G, Petrides P G. Biochemie und Pathobiochemie. *Springer Verlag*, Heidelberg, Berlin; 2014.

Lüllmann-Rauch R. Histologie Verstehen – Lernen – Nachschlagen. *Thieme Verlag*, Stuttgart; 2003.

Markovic M. Hypodontia in twins. *Swed Dent J Suppl*. 1982;15:153-62.

Marvin ML, Mazzoni SM, Herron CM, Edwards S, Gruber SB, Petty EM. AXIN2-associated autosomal dominant ectodermal dysplasia and neoplastic syndrome. *Am J Med Genet A* 2011;18:19-25.

Mikkola ML, Pispa J, Pekkanen M, Paulin L, Nieminen P, Kere J, Thesleff I. Ectodysplasin, a protein required for epithelial morphogenesis, is a novel TNF homologue and promotes cell-matrix adhesion. *Mechanisms of development* 1999;88(2):133-146.

Mitsui SN, Yasue A, Masuda K, Watanabe K, Horiuchi S, Imoto I, Tanaka E. Novel PAX9 mutations cause non-syndromic tooth agenesis. *J Dent Res*. 2014;245-9.

MLP Duale Reihe. Innere Medizin. Hrsg. Bob A., Bob K. *Thieme-Verlag*; 2009.

Mostowska A, Biedziak B, Trzeciak WH. A novel c.581C>T transition localized in a highly conserved homeobox sequence of MSX1: is it responsible for oligodontia? *J Appl Genet*. 2006;47(2):159-64.

Mostowska A, Biedziak B, Zadurska M, Dunin-Wilczynska I, Lianeri M, Jagodzinski PP. Nucleotide variants of genes encoding components of the Wnt signalling pathway and the risk of non-syndromic tooth agenesis. *Clin Genet*. 2013;84(5):429-40.

Mues G, Kapadia H, Wang Y, D'Souza RN. Genetics and human malformations. *J Craniofac Surg.* 2000;20(2):1652-4.

Mues G, Griggs R. From ectodermal dysplasia to selective tooth agenesis. *Am J Med Genet A.* 2009;149A(9):2037-41.

Mues G, Tardivel A, Willen L, Kapadia H, Seaman R, Frazier-Bowers S, Schneider P, D'Souza RN. Functional analysis of Ectodysplasin-A mutations causing selective tooth agenesis. *Eur J Hum Genet* 2010;18:19-25.

Mustonen T, Ilmonen M, Pummila M., Kangas AT, Laurikkala J, Jaatinen R, Pispä J, Gaide O, Schneider P, Thesleff I, Mikkola ML. Ectodysplasin A1 promotes placodal cell fate during early morphogenesis of ectodermal appendages. *Development.* 2004;131:4907-19.

Nieminen P, Arte S. Gene defect in hypodontia: exclusion of MSX1 and MSX2 as candidate genes. *Hum Genet.* 1995;96(3):305-8.

Nieminen P, Arte S, Tanner D, Paulin L, Alaluusua S, Thesleff I, Pirinen S. Identification of a nonsense mutation in the PAX9 gene in molar oligodontia. *Eur J Hum Genet.* 2001;9:743–746.

Nieminen P. Molecular Genetics of Tooth Agenesis. Academic Dissertation. Helsinki, University of Helsinki, 2007.

Nieminen P. Genetic basis of tooth agenesis. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2009; 312B(4):320-42.

Nikopensius T, Annilo T et al.. Non-syndromic tooth agenesis associated with a nonsense mutation in ectodysplasin-A (EDA). *J Dent Res.* 2013;92(6):507-11.

Nunn JH, Carter NE, Gillgrass TJ, Hobson RS, Jepson NJ, Meechan JG et al. The interdisciplinary management of hypodontia: background and role of paediatric dentistry. *Br Dent J* 2003;194:245-251.

Paixão-Côrtes VR, Braga T, Salzano FM, Mundstock K, Mundstock CA, Bortolini MC. PAX9 and MSX1 transcription factor genes in non-syndromic dental agenesis. *Arch Oral Biol.* 2011;56(4):337-44.

Pawlowska E, Janik-Papis K. Mutations in the human homeobox MSX1 gene in the congenital lack of permanent teeth. *Tohoku J Exp Med.* 2009;217(4):307-12.

Peterková R, Kristenová P, Lesot H, Lisi S, Vonesch JL, Gendrault JL, Peterka M. Different morphotypes of the tabby (EDA) dentition in the mouse mandible result from a defect in the mesio-distal segmentation of dental epithelium. *Orthod Craniofac Res.* 2002; 5(4):215-26.

Peters H, Neubüser A, Kratochwil K, Balling R. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev.* 1998; 12(17):2735-47.

Pispa J, Mustonen T, Mikkola ML, Kangas AT, Koppinen P, Lukinmaa PL, Jernvall J, Thesleff I.. Tooth patterning and enamel formation can be manipulated by misexpression of TNF receptor Edar. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 2004;231(2):432-440.

Plaisancié J, Bailleul-Forestier I, Gaston V, Vaysse F, Lacombe D, Holder-Espinasse M, Abramowicz M, Coubes C, Plessis G, Faivre L, Demeer B, Vincent-Delorme C, Dollfus H, Sigaudy S, Guillén-Navarro E, Verloes A, Jonveaux P, Martin-Coignard D, Colin E, Bieth E, Calvas P, Chassaing N. Mutations in WNT10A are frequently involved in oligodontia associated with minor signs of ectodermal dysplasia. *Am J Med Genet A.* 2013;161A(4):671-8.

Polder BJ, Van't Hof MA, Van der Linden FP, Kuijpers-Jagtman AM. A meta-analysis of the prevalence of dental agenesis of permanent teeth. *Community Dent Oral Epidemiol* 2004;32:217-226.

Prasad VS, Shivani V. Genetic significance of muscle segment homeo box1 gene in South Indian population for cleft lip and palate. *Indian J Hum Genet.* 2011;18(3):332-9.

Pummila M, Fliniaux I, Jaatinen R, James MJ, Laurikkala J, Schneider P, Thesleff I, Mikkola ML. Ectodysplasin has a dual role in ectodermal organogenesis: inhibition of Bmp activity and induction of Shh expression. *Development* 2007;134(1):117-125.

Qin H, Xu HZ. Clinical and genetic evaluation of a Chinese family with isolated oligodontia. *Arch Oral Biol.* 2013;58(9):1180-6.

Rasool M, Schuster J, Aslam M, Tariq M, Ahmad I, Ali A, Entesarian M, Dahl N, Baig SM. A novel missense mutation in the EDA gene associated with X-linked recessive isolated hypodontia. *J Hum Genet.* 2008;53(10):894-8.

Reddy NA, Adusumilli G, Devanna R, Pichai S, Rohra MG, Arjunan S. Msx1 Gene Variant – Its Presence in Tooth Absence – A Case Control Genetic Study. *J of Int Oral Health* 2013;5(5):20-6.

Riethe P. Die phylogenetische Reduktion des menschlichen Zahnbogens. *Fortschritte der Kieferorthopädie* 1959 Bd. 20, H. 3; 216-228.

Rolling S, Poulsen S. Oligodontia in Danish schoolchildren. *Acta Odontol Scand* 2001; 59: 111-112.

Ruf S, Klimas D, Hönemann M, Jabir S. Genetic background of nonsyndromic oligodontia: a systematic review and meta-analysis. *J Orofac Orthop.* 2013;74(4):295-308.

Salem G. Prevalence of selected dental anomalies in Saudi children from Gizan region. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1989;17(3):162-3.

Satokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet.* 1994;6(4):348-56.

Scarel RM, Trevilatto PC, Di Hipólito O Jr, Camargo LE, Line SR. Absence of mutations in the homeodomain of the MSX1 gene in patients with hypodontia. *Am J Med Genet.* 2000;92(5):346-9.

Schalk-van der Weide Y, Stehen WH, Bosman F. Distribution of missing teeth and tooth morphology in patients with oligodontia. *ASDC J Dent Child* 1992;59:133-140.

Schalk-van der Weide Y, Prahl-Andersen B, Bosman F. Tooth formation in patients with oligodontia. *Angle Orthod* 1993;63:31-37.

Schneider H, Hammersen J, Preisler-Adams S, Huttner K, Rascher W, Bohring A. Sweating ability and genotype in individuals with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *J Med Genet.* 2011;48(6):426-32.

Schopf P. Curriculum Kieferorthopädie. *Quintessenz Verlags-GmbH,* Berlin, 2008.

Silverman NE, Ackerman JL. Oligodontia: a study of its prevalence and variation in 4032 children. *ASDC J Dent Child* 1979;46:470-477.

Sliwinski T, Synowiec E, Czarny P, Gomulak P, Forma E, Morawiec Z, Morawiec J, Dziki L, Wasylecka M, Blasiak J. The c.469+46_56del mutation in the homeobox MSX1 gene-a novel risk factor in breast cancer? *Cancer Epidemiol.* 2010;34(5):652-5.

Song S, Han D, Qu H, Gong Y, Wu H, Zhang X, Zhong N, Feng H. EDA gene mutations underlie non-syndromic oligodontia. *J Dent Res.* 2009;88(2):126-31.

Song S, Zhao R, He H, Zhang J, Feng H, Lin L. WNT10A variants are associated with non-syndromic tooth agenesis in the general population. *Hum Genet.* 2014;117-24.

Stockton DW, Das P, Goldenberg M, D'Souza RN, Patel PI. Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. *Nat Genet* 2000;24:18-19.

Suri S, Tompson BD, Atenafu E. Prevalence and patterns of permanent tooth agenesis in Down syndrome and their association with craniofacial morphology. *Angle Orthod.* 2011;81(2):260-9.

Svinhufvud E, Myllärniemi S, Norio R. Dominant inheritance of tooth malpositions and their association to hypodontia. *Clin Genet.* 1988;34(6):373-81.

Tan SP, van Wijk AJ, Prahl-Andersen B. Severe hypodontia: identifying patterns of human tooth agenesis. *Eur J Orthod* 2011;33(2):150-4.

Tao R, Jin B, Guo SZ, Qing W, Feng GY, Brooks DG, Liu L, Xu J, Li T, Yan Y, He L. A novel missense mutation of the EDA gene in a Mongolian family with congenital hypodontia. *J Hum Genet.* 2006;51:498–502.

Tarpey P, Pemberton TJ, Stockton DW, Das P, Ninis V, Edkins S, Andrew Futreal P, Wooster R, Kamath S, Nayak R, Stratton MR, Patel PI. A novel Gln358Glu mutation in ectodysplasin A associated with X-linked dominant incisor hypodontia. *Am J Med Genet A.* 2007;143(4):390-4.

Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci.* 2003;116:1647–1648.

Thesleff I, Nieminen P. Tooth morphogenesis and cell differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 2006;8:844–850.

Tongkobpetch S, Siriwan P, Shotelersuk V. MSX1 mutations contribute to nonsyndromic cleft lip in a Thai population. *J Hum Genet.* 2006;51(8):671-6.

Tucker AS, Headon DJ, Schneider P, Ferguson BM, Overbeek P, Tschopp J, Sharpe PT. Edar/Eda interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis. *Development* 2000;127(21):4691-4700.

van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, van Amstel HK. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet.* 2000;24(4):342-3.

van den Boogaard MJ, Créton M, Bronkhorst Y, van der Hout A, Hennekam E, Lindhout D, Cune M, Ploos van Amstel HK. Mutations in WNT10A are present in more than half of isolated hypodontia cases. *J Med Genet.* 2012;49(5):327-31.

van Wijk AJ, Tan SP. A numeric code for identifying patterns of human tooth agenesis: a new approach. *Eur J Oral Sci* 2006; 114: 97-101.

Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman JG, Seidman CE. A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nat Genet* 1996;13:417-421.

Vastardis H. The genetics of human tooth agenesis: new discoveries for understanding dental anomalies. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2000;117:650-656.

Vieira AR, Meira R, Modesto A, Murray JC. MSX1, PAX9, and TGFA contribute to tooth agenesis in humans. *J Dent Res* 2004;83:723–727.

Wong SW, Liu HC, Han D, Chang HG, Zhao HS, Wang YX, Feng HL. A novel non-stop mutation in MSX1 causing autosomal dominant non-syndromic oligodontia. *Mutagenesis.* 2014; 29(5):319-23.

WORLD MEDICAL ASSOCIATION. Declaraton of Helsinki; Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjcts. WMA General Assembly 2008.

Yamashiro T, Zheng L, Shitaku Y, Saito M, Tsubakimoto T, Takada K, Takano-Yamamoto T, Thesleff I. Wnt10a regulates dentin sialophosphoprotein mRNA expression and possibly links odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. *Differentiation*; research in biological diversity 2007;75(5):452-462.

Yan Y, Tang D, Chen M, Huang J, Xie R, Jonason JH, Tan X, Hou W, Reynolds D, Hsu W, Harris SE, Puzas JE, Awad H, O'Keefe RJ, Boyce BF, Chen D. Axin2 controls bone remodeling through the beta-catenin-BMP signaling pathway in adult mice. *J Cell Sci* 2009;122:3566-78.

Yang Y, Luo L et al.. Novel EDA p.Ile260Ser mutation linked to non-syndromic hypodontia. *J Dent Res.* 2013;92(6):500-6.

Yonezu T, Hayashi Y et al.. Prevalence of congenital dental anomalies of the deciduous dentition in Japanese children. *Bull Tokyo Dent Coll.* 1997;38(1):27-32.

Zhang H, Quan C, Sun LD, Lv HL, Gao M, Zhou FS, Xiao FL, Fang QY, Shen YJ, Zhou L, Yang S, Zhang XJ .A novel frameshift mutation of the EDA1 gene in a Chinese Han family with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Clin Exp Dermatol.* 2009;34(1):74-6

Zhu J, Yang X, Zhang C, Ge L, Zheng S. A novel nonsense mutation in PAX9 is associated with sporadic hypodontia. *Mutagenesis.* 2012;27(3):313-7.

Internetquellen:

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/d/d3/Mature_mRNA.png

<http://www.ensembl.org/>

<http://www.helsinki.fi/science/dentgen/bg.html>

<http://www.medicoconsult.de/wiki>

http://www.onmeda.de/krankheiten/morbus_scheuermann.html

<http://www.toothagenesiscodex.com/>

<http://de.wikipedia.org/wiki/Code-Sonne>

<http://de.wikipedia.org/wiki/Syndrom>

http://de.wikipedia.org/wiki/Untranslatierter_Bereich

4 Anhang

4 Anhang

4.1 Primersequenzen MSX1, EDA und AXIN2

Die purifizierte DNA wurde bei dem Verdacht auf EDA-Mutation an die Firma Microsynth, Zürich weitergeleitet. Diese Primersequenzen wurden von der Firma festgelegt und sind nicht bekannt.

Die Analyse der Gene MSX1 und AXIN2 erfolgte in der Poliklinik für Kieferorthopädie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Verwendete Primersequenzen MSX1 und AXIN2:

MSX1

Exon1

Fw 5' CCCGGAGCCCATGCCCGGCGGCTG 3'

Rv 5' CTC CCT CTG CGC CTG GGT TCT GGC T 3'

Exon 2

Fw 5' ACT TGG CGG CAC TCA ATA TC 3'

Fw Seq. 5' TTT CTT TCG GCC CTC AG 3'

Rv 5' GTT AAA GGG AAG GCG GCT G 3'

Für Exon 2 des Gens MSX1 wurden zwei Forward Primer (Fw) verwendet. Der erste wurde zur Amplifizierung genutzt. Da das Exon 2 eine Poly-T-Region, also eine Region, in der viele (in der Regel neun) Thymin-Basen vorkommen, aufweist und diese weiterhin bei vielen Probanden Polymorphismen zeigte, musste für die Sequenzierung ein anderer Primer (Fw. Seq) verwendet werden. Ohne Verwendung des zweiten Primers kommt es bei der Sequenzierung nicht zur Bindung des ersten Primers.

Axin2

Exon 8

Fw 5' CTG AGC AGA ATA GAC AAG TTT CTA 3'

Rv 5' GAG ACC CAG GCA GAA AGA GAG 3'

Exon 9

Fw 5' CAA TTG CTC TGG GGA CAA CA 3'

Rv 5' CTC CAG ATA GCG AAT ATT CTG 3'

4.2 PCR-Ansätze MSX1, EDA und AXIN2

Der PCR-Ansatz für MSX1 und AXIN 2 war identisch, der PCR-Ansatz für EDA unterschied sich von diesem.

Die PCR Ansätze für MSX1 und AXIN2 wurden mit einem HotStar HiFidelity Polymerase Kit (100) (Cat. N: 202602) der Firma Qiagen hergestellt. Der PCR Ansatz für EDA wurde durch die Firma Microsynth, Zürich durchgeführt und ist nicht bekannt.

Der PCR-Ansatz für eine Reaktion lautet:

Tab. 4.2.1: PCR-Ansatz für MSX1 und AXIN2

	Ansatz zur Amplifizierung
Bi Dest. Wasser:	18 µl
5x HotStar HiFidelity PCR Buffer (incl. dNTPs):	10 µl
5x Q-Solution:	10 µl
Primer Fw (Dil. 10pmol/µl):	5 µl
Primer Rv (Dil. 10pmol/µl):	5 µl
100 units HotStar HiFidelity DNA Polymerase:	1 µl
DNA 1 µl (22,5 ng/100 Basenpaare PCR Produkt auf 15 µl Volumen)	1 µl
TOTAL	50 µl

4.3 Familienbeschreibungen der Familien ohne Genmutation

Im nachfolgenden Anhang sind alle teilnehmenden Oligodontiefamilien beschrieben, bei denen keine Mutationen der Gene MSX1, AXIN2 bzw. EDA gefunden werden konnten.

4.3.1 Familien mit MSX1-Verdacht

Familie V-MSX1-3

Der Proband III:1 der Familie V-MSX1-3 wurde behandelt (Abb. 4.3.1). Der Proband III:1 zeigte anamnestisch sechs Nichtanlagen mit einer TAC-Summe von 60 (TAC Quadrantenwerte 18, 18, 8, 16). Bei dem Vater (II:3) und bei der Tante (II:7) sind ebenso Zähne nicht angelegt. Der Halbbruder des Probanden (III:2), die Cousinen (III:3, III:4) wie auch die Mutter (II:2), die Stiefmutter (II:4), zwei Tanten (II:1, II:5) und der Onkel (II:6) zeigen keine Nichtanlagen. Die Großeltern sind verstorben; jedoch war die Großmutter (I:2) anamnestisch oligodont. Der Familienstammbaum ist in Abb. 4.3.2 dargestellt.

An der Studie nahmen die Probanden II:2, II:3, II:4, II:7, III:1 und III:2 teil.



6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC	Summe				
	X			X			X			X			<table border="1"><tr><td>18</td><td>18</td></tr><tr><td>8</td><td>16</td></tr></table>	18	18	8	16	=60
18	18																	
8	16																	
		X						X										
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7					



Abb. 4.3.1: Familie V-MSX1-3. Proband III:1 im Alter von 11 Jahren. Enface-Bild, Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

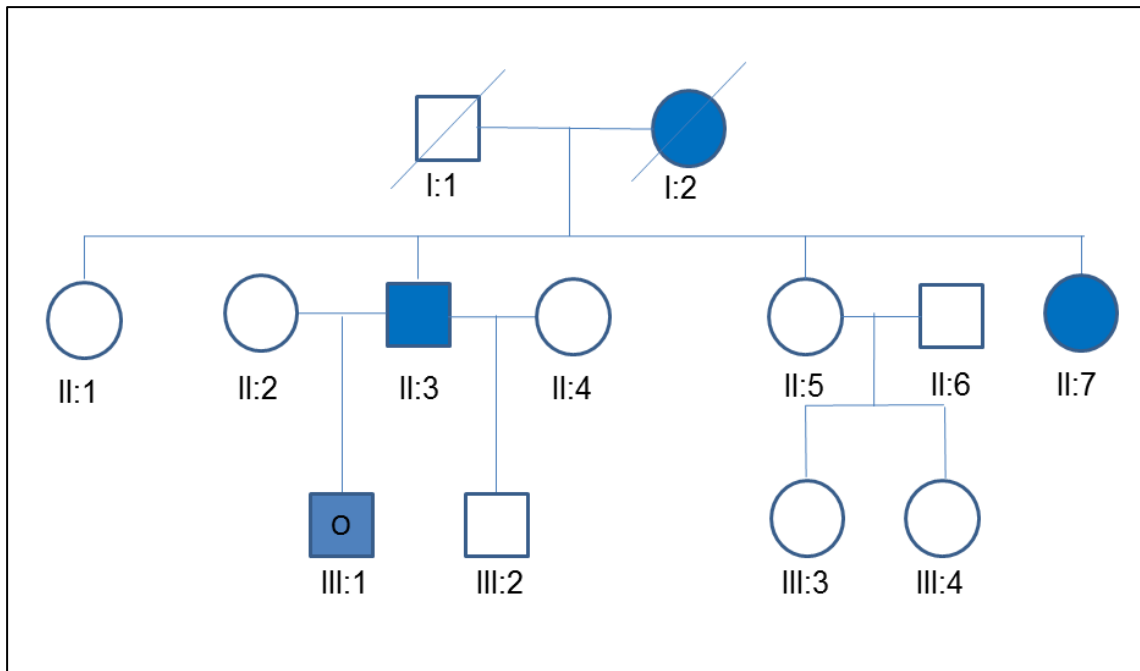


Abb.4.3.2: Familienstammbaum der Familie V-MSX1-3.

Familie V-MSX1-4

Ein Sohn der Familie V-MSX1-4 wurde behandelt (Abb. 4.3.3). Die Proband II:1 zeigte anamnestisch sechs Nichtanlagen mit einer TAC-Summe von 80 (TAC Quadrantenwerte 24, 24, 16, 16). Bei der Mutter (I:1) sind ebenfalls Nichtanlagen vorhanden. Der Vater (I:2) und die Geschwister (II:2, II:3) haben eine normale Dentition. Der Familienstammbaum ist in Abb. 4.3.4 dargestellt.

An der Studie nahmen die Probanden I:1, I:2, II:1, II:2, II:3 teil.



7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC		Summe
		X	X							X	X			24	24	=80
		X									X			16	16	
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7			



Abb. 4.3.3: Familie V-MSX1-4. Proband II:1 im Alter von 20 Jahren. Enface-Bild, Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

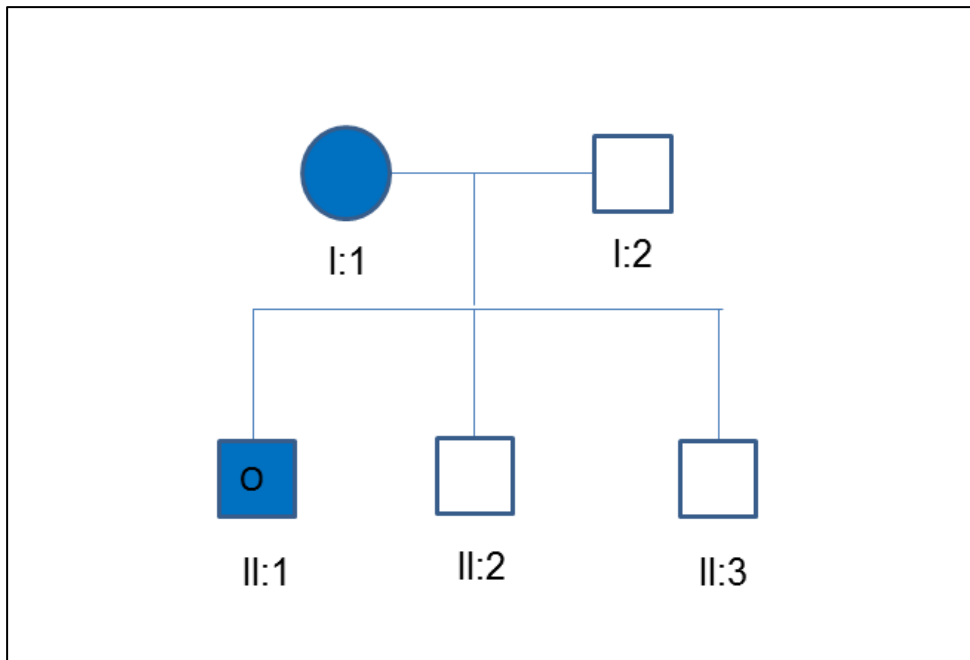


Abb. 4.3.4: Familienstammbaum der Familie V-MSX1-4.

Familie V-MSX1-5

Eine Tochter der Familie V-MSX1-5 wurde behandelt (Abb. 4.3.5). Die Probandin II:1 zeigte anamnestisch acht Nichtanlagen mit einer TAC-Summe von 96 (TAC Quadrantenwerte 24, 24, 24, 24). Bei dem Vater (I:2) und bei den Geschwistern (II:1, II:3, II:4) sind ebenfalls Nichtanlagen vorhanden. Der Familienstammbaum ist in Abb. 4.3.6 dargestellt.

An der Studie nahmen die Probanden I:1, I:2, II:1, II:2, II:3 teil.



7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC		Summe
			X	X						X	X			24	24	=96
			X	X						X	X			24	24	
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7			



Abb. 4.3.5: Familie V-MSX1-5. Proband II:1 im Alter von 15 Jahren. Enface-Bild, Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

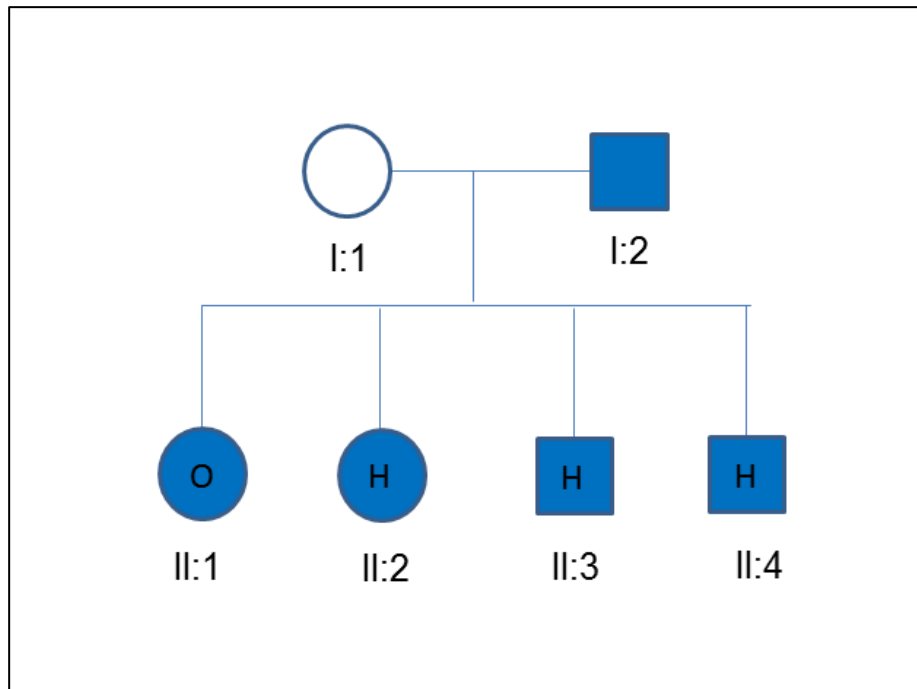


Abb. 4.3.6: Familienstammbaum der Familie V-MSX1-6.

Familie V-MSX1-7

Ein Sohn der Familie V-MSX1-7 wurden behandelt (Abb. 4.3.7). Der Proband III:7 zeigte anamnestisch sieben Nichtanlagen mit einer TAC-Summe von 178 (TAC Quadrantenwerte 8, 10, 80, 80). Bei der Mutter (II:5) und bei der Großmutter (I:1) sind ebenso wie bei der Cousine (III:1) Zähne nicht angelegt. Der Bruder des Probanden (III:6), die Cousins und Cousinen (III:2, III:3, III:4, III:5) wie auch der Vater (II:6), beide Onkel (II:2, II:4) und die Schwestern der Mutter (II:1, II:3) zeigen keine Nichtanlagen. Der Familienstammbaum ist in Abb. 4.3.8 dargestellt.

An der Studie nahmen die Probanden I:1, II:1, II:3, II:4, II:5, III:1, III:2, III:3, II:4, III:5, III:6 sowie III:7 teil.



7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC		Summe
														8	10	=178
														80	80	



Abb. 4.3.7: Familie V-MSX1-7. Proband III:7 im Alter von 15 Jahren. Enface-Bild, Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

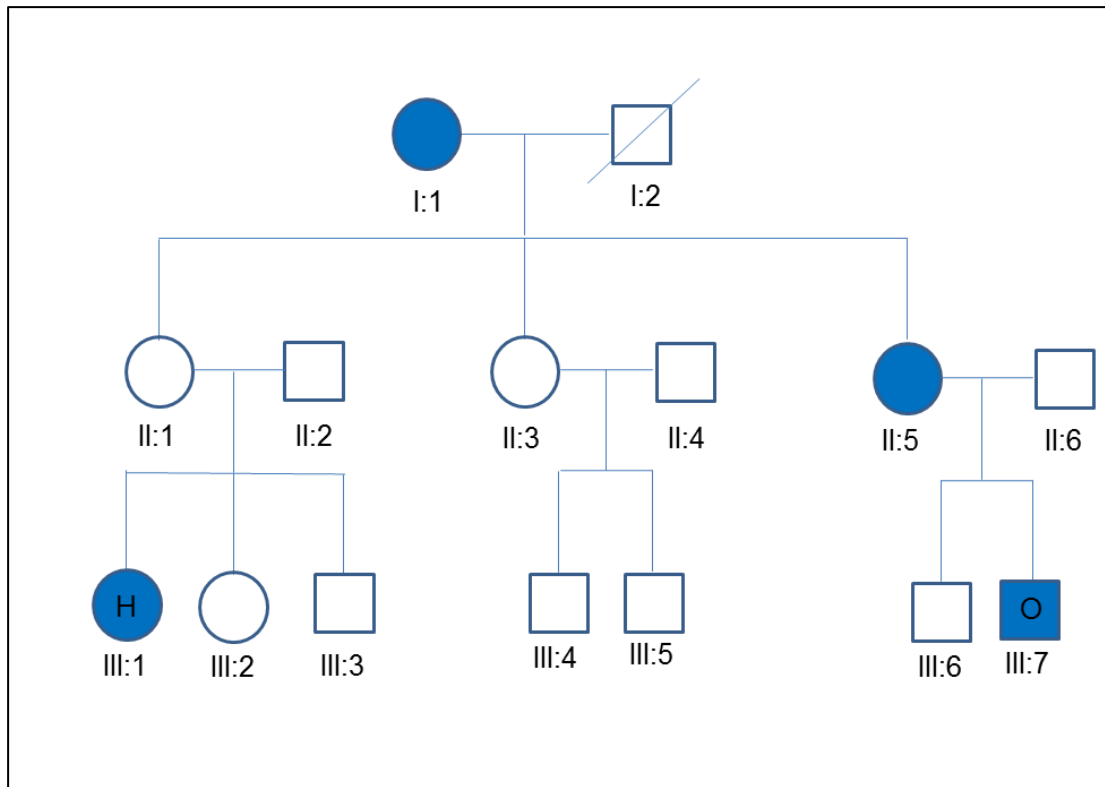


Abb. 4.3.8: Familienstammbaum der Familie V-MSX1-7.

Familie V-MSX1-8

Eine Tochter der Familie V-MSX1-8 wurde behandelt (Abb. 4.3.9). Die Probandin IV:2 zeigte anamnestisch zehn Nichtanlagen mit einer TAC-Summe von 214 (TAC Quadrantenwerte 24, 26, 80, 84). Bei beiden Elternteilen (III:1, III:2) sind ebenso wie bei den Geschwistern (IV:1, IV:3, IV:4) keine Nichtanlagen vorhanden. Der Familienstammbaum ist in Abb. 4.3.10 dargestellt.

An der Studie nahmen die Probanden III:1, III:2, VI:1, VI:2, VI:3 sowie VI:4 teil.



7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC		Summe
		X	X					X		X	X			24	26	=214
X		X							X		X		X	80	84	
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7			



Abb. 4.3.9: Familie V-MSX1-8. Proband IV:2 im Alter von 15 Jahren. Enface-Bild, Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

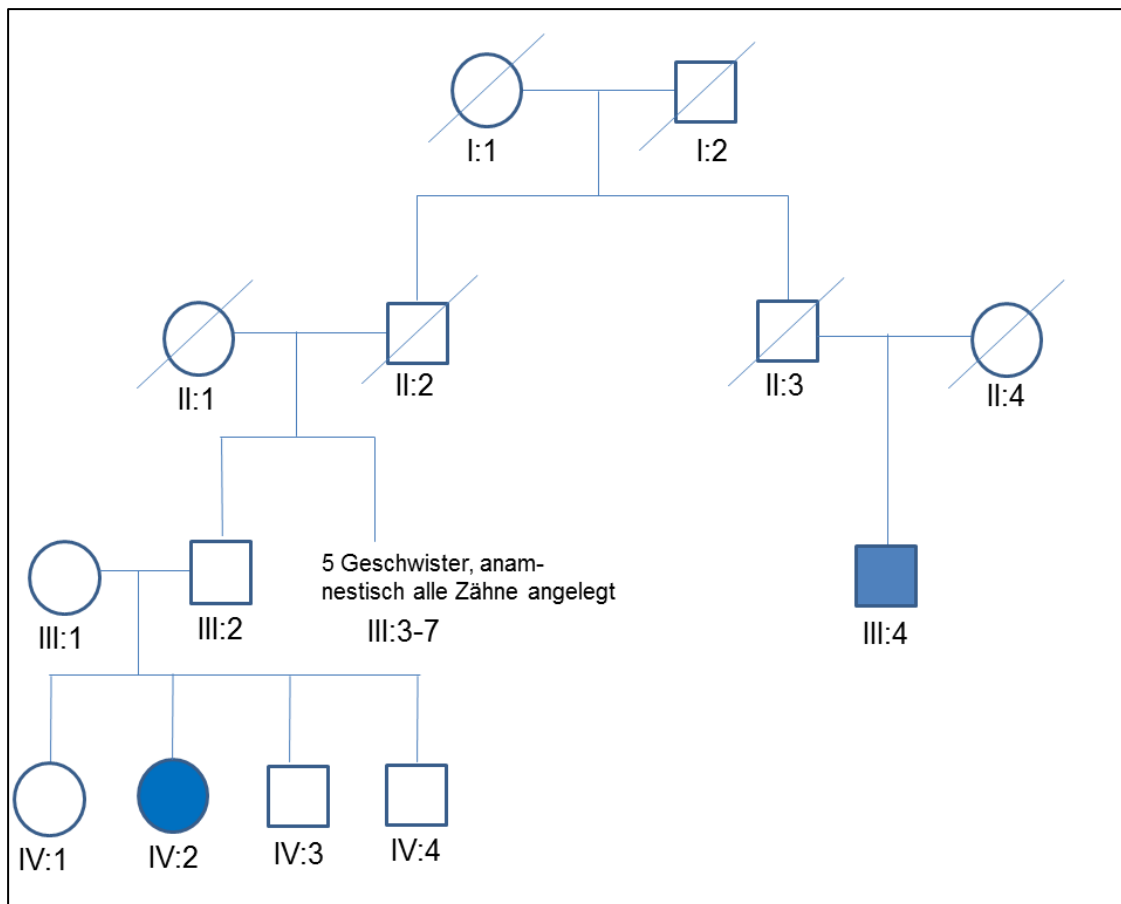


Abb. 4.3.10: Familienstammbaum der Familie V-MSX1-8.

Familie V-MSX1-9

Drei Töchter der Familie V-MSX1-9 wurden behandelt. Die Probandin II:1 (Abb. 4.3.11) zeigte anamnestisch sechs Nichtanlagen mit einer TAC-Summe von 132 (TAC Quadrantenwerte 34, 34, 32, 32) während bei ihrer jüngeren Schwester II:2 (Abb. 4.3.12) zwei Zähne kongenital fehlten. Die TAC-Summe dieses Probanden betrug 4 (TAC Quadrantenwerte 2, 2, 0 und 0). Bei der jüngsten Schwester wurde im Verlauf der Studie ein OPG angefertigt, sie zeigt eine Nichtanlage (Abb. 4.3.13). Der Vater weist ebenfalls Nichtanlagen auf (Abb. 4.3.15). Bei der Mutter (I:2) (Abb. 4.3.14) sind keine Nichtanlagen vorhanden. Der Familienstammbaum ist in Abb. 4.3.16 dargestellt.

An der Studie nahmen die Probanden I:1, I:2, II:1, II:2, sowie II:3 teil. Der Zahnstatus der Probanden I:1 sowie I:2 wurde anhand eines vom Hauszahnarzt erstellten Orthopantogramms erhoben.



7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC	Summe				
	X					X		X					X	<table><tr><td>34</td><td>34</td></tr><tr><td>32</td><td>32</td></tr></table>	34	34	32	32	=132
34	34																		
32	32																		
	X											X							
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7						



Abb. 4.3.11: Familie V-MSX1-9. Proband III:1 im Alter von 13 Jahren. Enface-Bild, Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

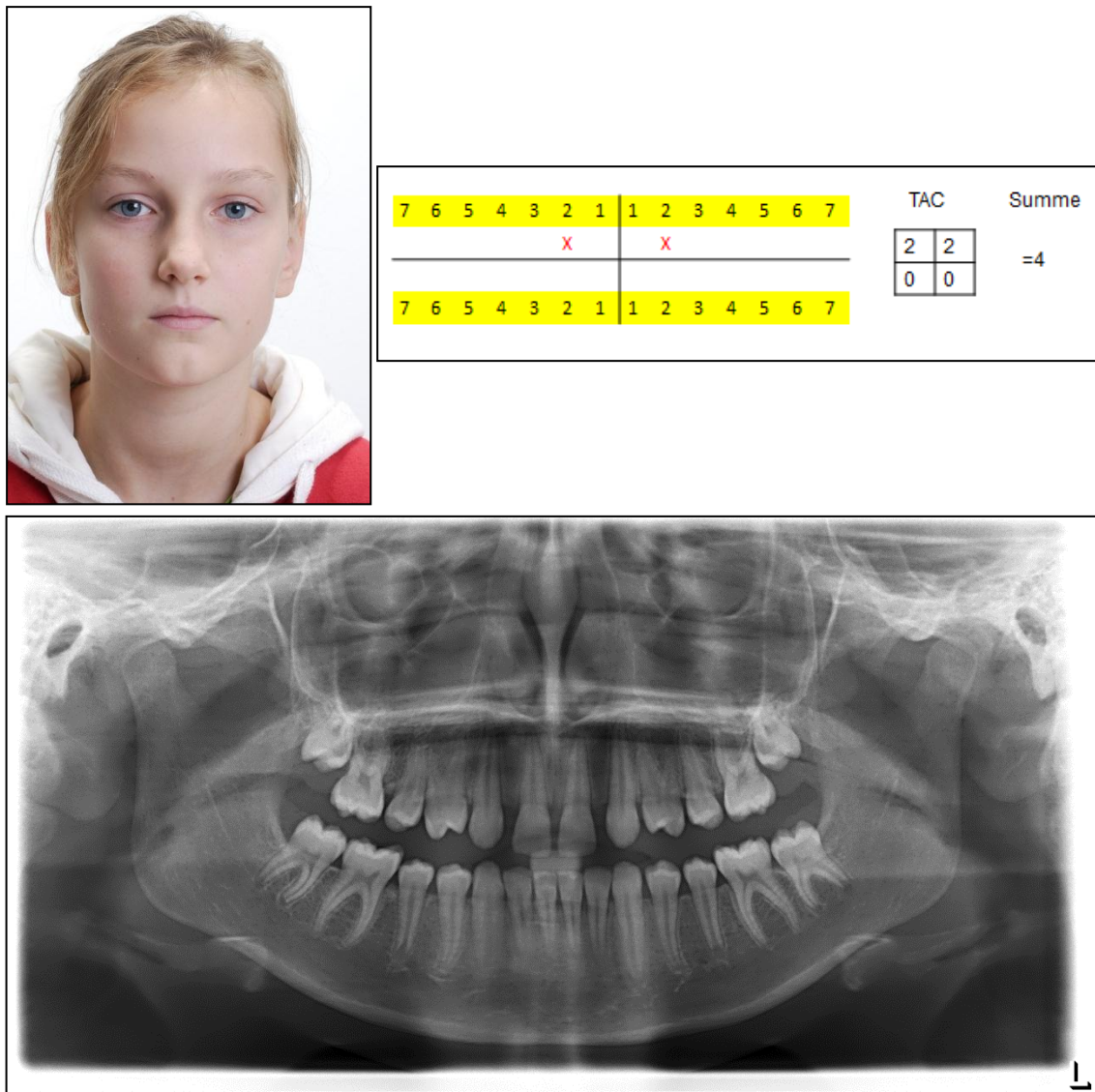


Abb. 4.3.12: Familie V-MSX1-9. Proband II:2 im Alter von 11 Jahren. Enface-Bild, Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7

0	64
0	0

Summe
=64



Abb. 4.3.13: Familie V-MSX1-9. Proband II:2 im Alter von 10 Jahren. Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC	Summe
														0	0
														0	0
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7		=0

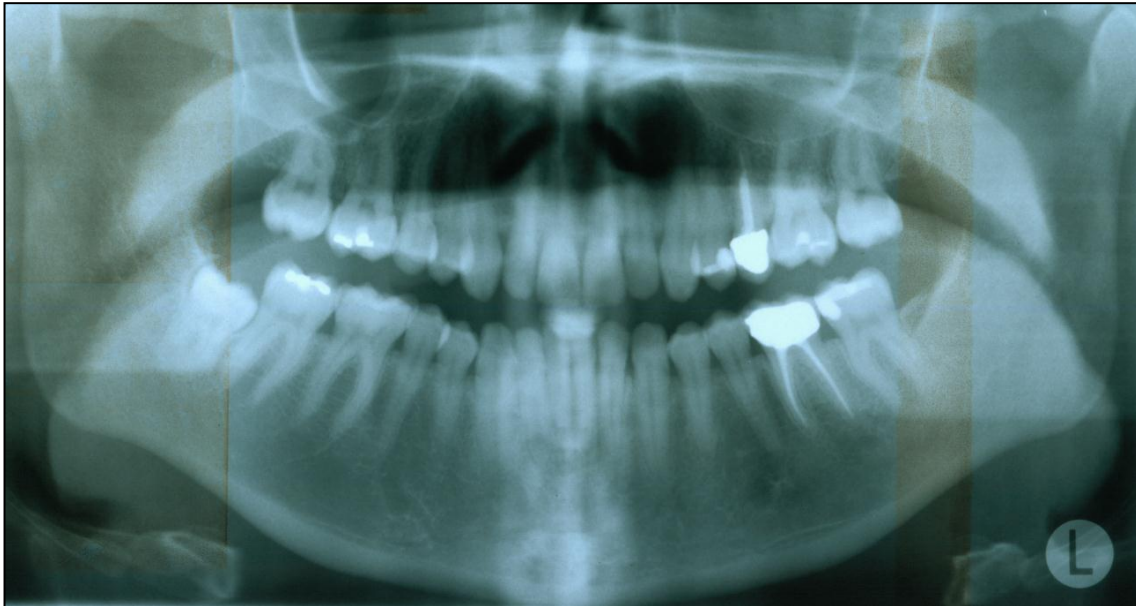


Abb. 4.3.14: Familie V-MSX1-9. Proband I:1, erwachsen (29 Jahre). Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC	Summe
					X			X						2	2
												X		0	32
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7		=36

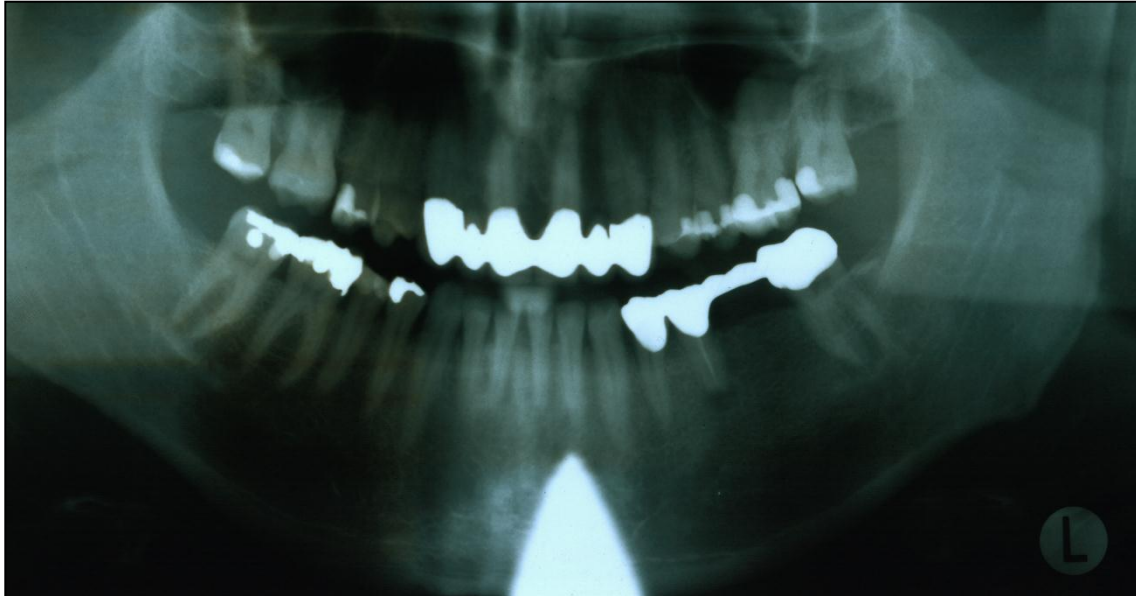


Abb. 4.3.15: Familie V-MSX1-9. Proband I:2, erwachsen (34 Jahre). Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

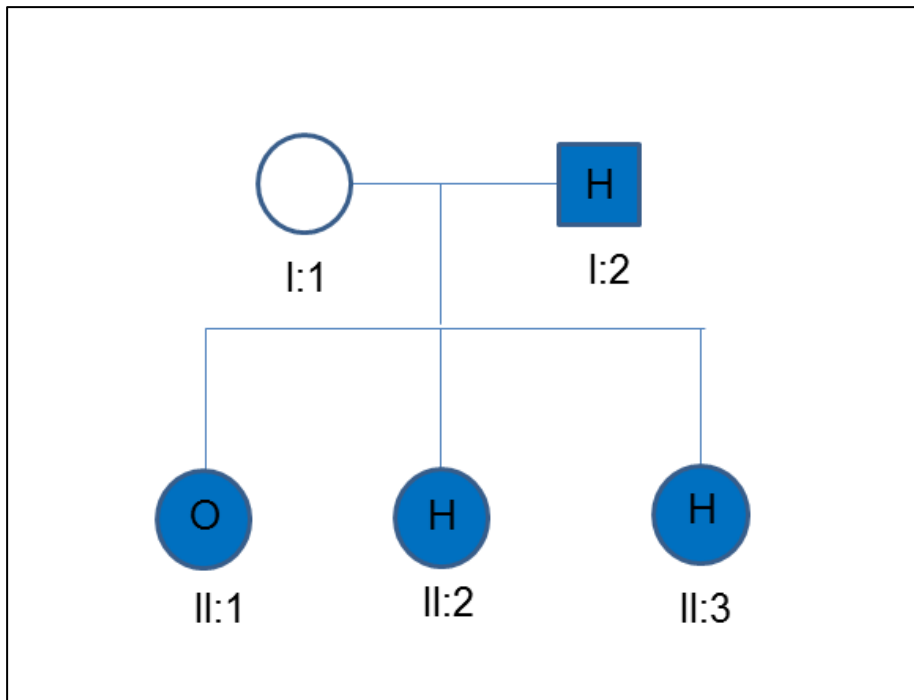


Abb. 4.3.16: Familienstammbaum der Familie V-MSX1-9.

Familie V-MSX1-11

Ein Sohn der Familie V-MSX1-11 wurde behandelt (Abb. 4.3.17). Der Proband II:1 zeigte anamnestisch sechs Nichtanlagen mit einer TAC-Summe von 70 (TAC Quadrantenwerte 22, 16, 16, 16). Bei der Mutter (I:1) sind ebenfalls Nichtanlagen vorhanden. Der Vater (I:2) und die Schwester (II:2) haben eine normale Dentition.

Der Familienstammbaum ist in Abb. 4.3.18 dargestellt.

An der Studie nahmen die Probanden I:1 und II:1 teil.



7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC		Summe
		X			X	X						X		22	16	=70
		X										X		16	16	
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7			



Abb. 4.3.17: Familie V-MSX1-11. Proband II:1 im Alter von 15 Jahren. Enface-Bild, Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

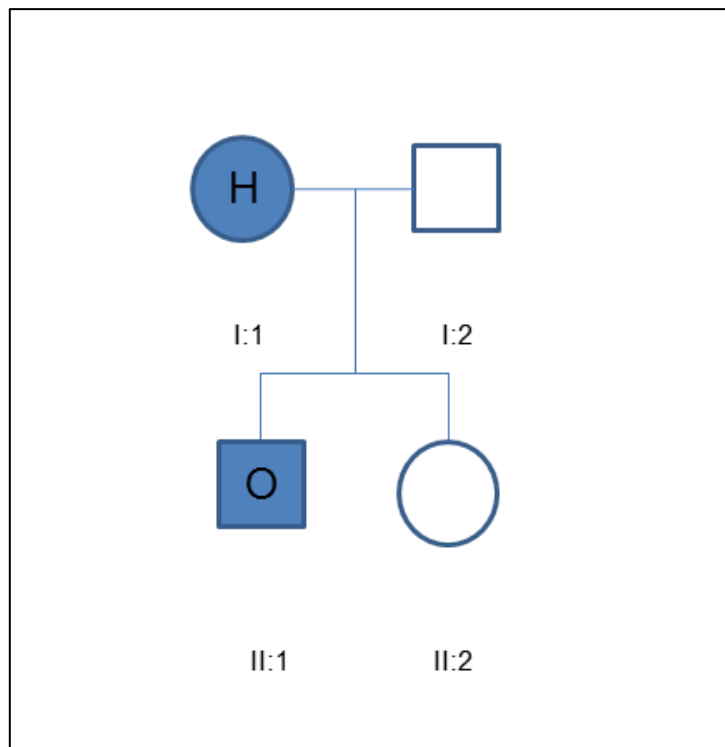


Abb. 4.3.18: Familienstammbaum der Familie V-MSX1-11.

4.3.2 Familien mit EDA-Verdacht

Familie V-EDA-1

Der Proband III:1 der Familie V-EDA-1 war oligodont und zeigte anamnestisch acht Nichtanlagen mit einer TAC-Summe von 74 (TAC Quadrantenwerte 34, 34, 3, 3) (Abb. 4.3.19).

Nach Aufstellung eines Familienstammbaumes stellte sich heraus, dass bei der Mutter (II:1) sowie bei dem Vater (II:2) des Probanden alle Zähne angelegt sind. Der Vater (II:2) hat zwei Brüder mit normaler Dentition (II:4, II:6), wovon ein Bruder (II:4) zwei Töchter hat, bei denen ebenfalls alle Zähne angelegt sind. Der Bruder II:6 hat eine Tochter, welche hypodont ist. Die Großeltern des Patienten (II:1, II:2) haben beide keine Nichtanlagen. Der Familienstammbaum ist in Abb. 4.3.20 dargestellt.

An der Studie nahmen die Probanden I:1, I:2, II:1, II:2, II:3, II:4, II:5, II:6, III:1, III:2, III:3 sowie III:4 teil.



7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC		Summe
X					X		X						X	34	34	
					X	X	X	X						3	3	=74
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7			



Abb. 4.3.19: Familie V-EDA-1. Proband III:1 im Alter von 14 Jahren. Enface-Bild, Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

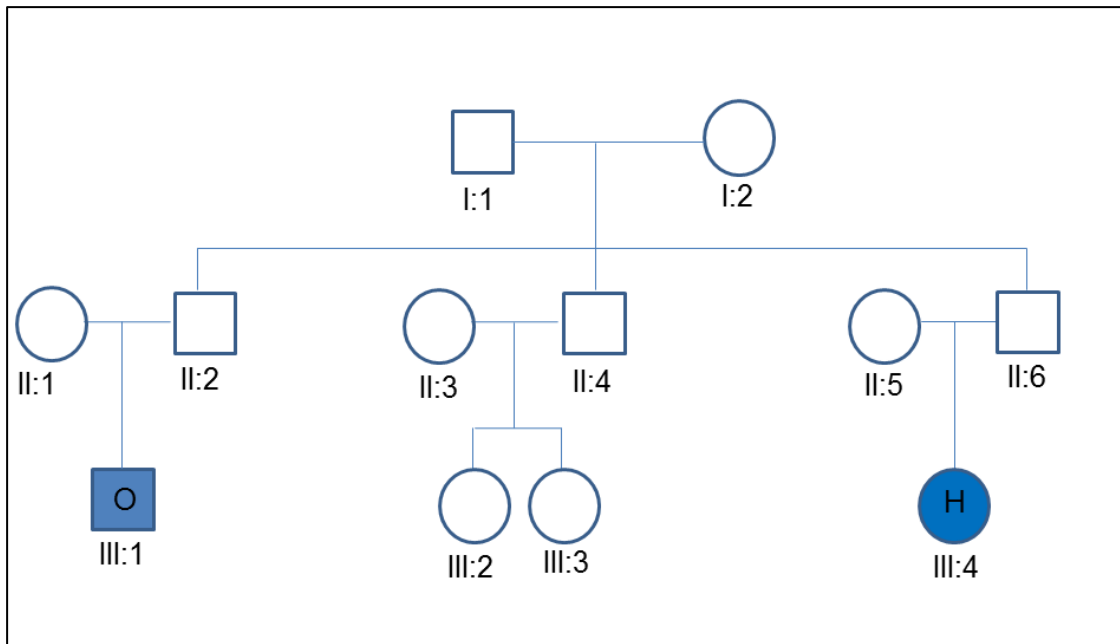


Abb. 4.3.20: Familienstammbaum der Familie V-EDA-1.

Familie V-EDA-2

Der Proband II:3 der Familie V-EDA-2 war oligodont und zeigte anamnestisch sieben Nichtanlagen mit einer TAC-Summe von 54 (TAC Quadrantenwerte 18, 18, 1, 17) (Abb. 4.3.21).

Nach Aufstellung eines Familienstammbaumes stellte sich heraus, dass bei der Mutter (II:1) ebenfalls Nichtanlagen zu finden waren. Der Vater (II:2) des Probanden sowie die beiden älteren Schwestern (II:1, II:2) hatten eine normale Dentition. Der Familienstammbaum ist in Abb. 4.3.22 dargestellt.

An der Studie nahmen die Probanden I:1, I:2, II:1, II:2 sowie II:3 teil.



7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC	Summe
					X					X				18	18
						X		X			X			1	17
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7		=54



Abb. 4.3.21: Familie V-EDA-2. Proband III:3 im Alter von 7 Jahren. Enface-Bild, Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

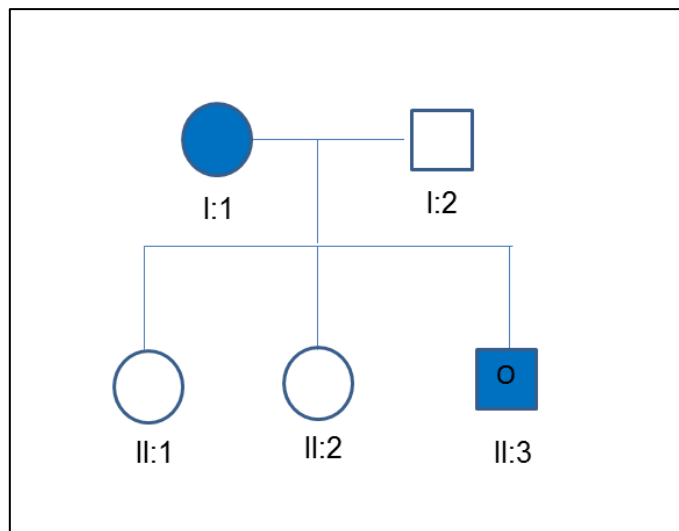


Abb. 4.3.22: Familienstammbaum der Familie V-EDA-2

Familie V-EDA-4

Die Probandin II:1 der Familie V-EDA-4 war oligodont und zeigte anamnestisch acht Nichtanlagen mit einer TAC-Summe von 44 (TAC Quadrantenwerte 2, 2, 19, 19) (Abb. 4.3.23). Nach Aufstellung eines Familienstammbaumes zeigt sich, dass bei der Mutter (II:1) und ebenso bei der Schwester (II:2), zwei Nichtanlagen zu finden sind. Der Vater (II:2) des Probanden hat eine normale Dentition. Der Bruder der Probandin II:1 hat drei Nichtanlagen. Der Familienstammbaum ist in Abb. 4.3.24 dargestellt.

An der Studie nahmen die Probanden I:1, I:2, II:1, II:2 sowie II:3 teil.



7 6 5 4 3 2 1							1	2	3	4	5	6	7	TAC		Summe
					X			X						2	2	=42
	X				X	X	X	X			X			19	19	
7 6 5 4 3 2 1							1	2	3	4	5	6	7			



Abb. 4.3.23: Familie V-EDA-4. Proband II:1 im Alter von 22 Jahren. Enface-Bild, Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

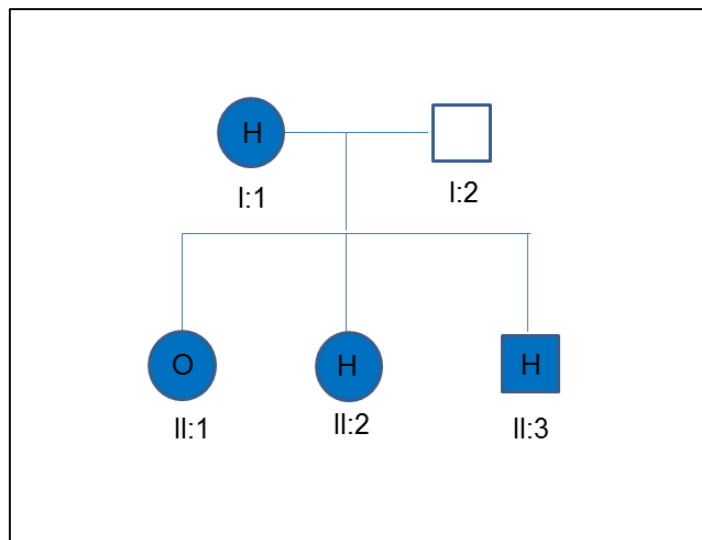


Abb. 4.3.24: Familienstammbaum der Familie V-EDA-4.

Familie V-EDA-5

Der Proband V:1 der Familie V-EDA-5 war oligodont und zeigte anamnestisch sechs Nichtanlagen mit einer TAC-Summe von 38 (TAC Quadrantenwerte 2, 2, 17, 17) (Abb. 4.3.25). Nach Aufstellung eines Familienstammbaumes zeigt sich, dass bei der Mutter (IV:2), ebenso bei der Urgroßmutter (II:2) sowie bei der Urgroßtante (II:3) Nichtanlagen zu finden sind. Der Vater (II:2) und die Schwester (V:2) des Probanden haben eine normale Dentition. Die Tante (IV:3) und auch Großeltern des Probanden (II:1, II:2) haben ebenso keine Nichtanlagen. Der Familienstammbaum ist in Abb. 4.3.26 dargestellt.

An der Studie nahmen die Probanden II:2, II:3, III:2, IV:1, IV:2, IV:3, V:1, V:2 teil.



7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC	Summe				
					X			X						<table><tr><td>2</td><td>2</td></tr><tr><td>17</td><td>17</td></tr></table>	2	2	17	17	=38
2	2																		
17	17																		
		X			X	X				X									
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7						

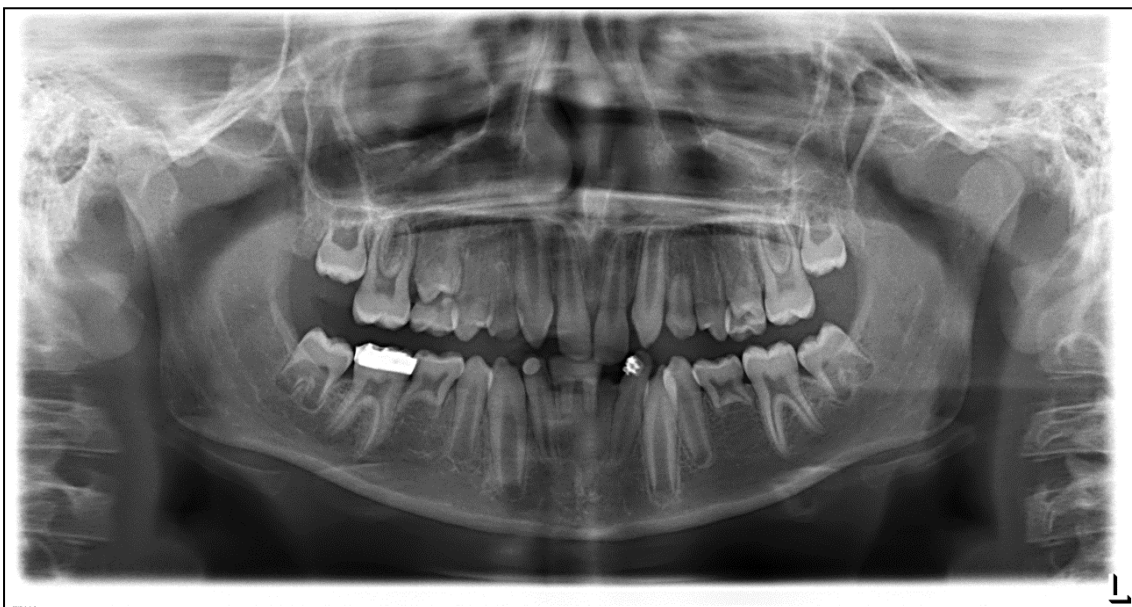


Abb. 4.3.25: Familie V-EDA-5. Proband V:1 im Alter von 11 Jahren. Enface-Bild, Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

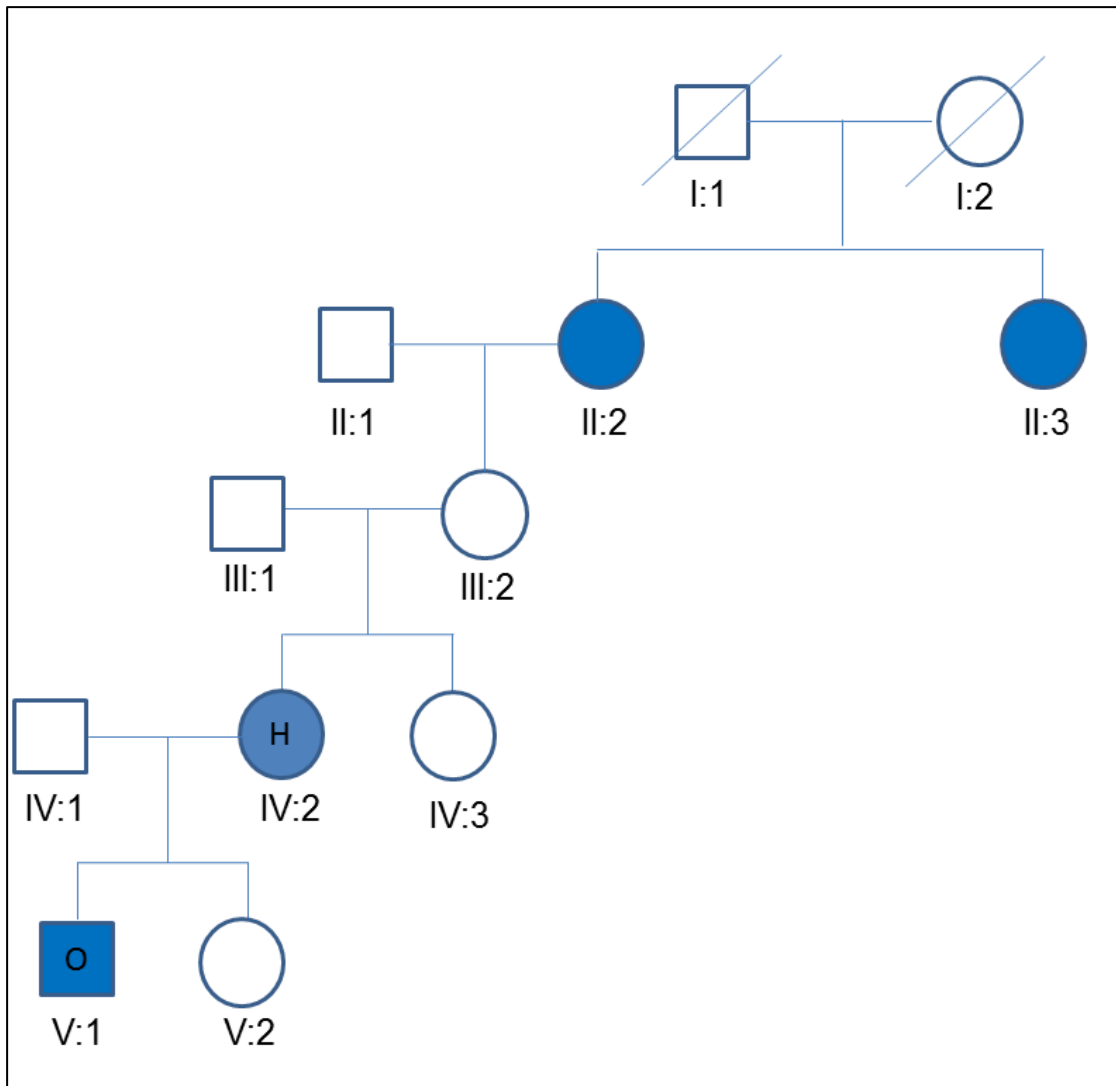


Abb. 4.3.26: Familienstammbaum der Familie V-EDA-5.

4.3.3 Familien mit AXIN2-Verdacht

Im Probandengut fanden sich drei Familien mit Verdacht auf AXIN2-Mutation (Familie V-AXIN2-1, Familie V-AXIN2-2, Familie V-AXIN2-3). Nach Ruf et al. 2013 liegen die TAC-Summen in 90% der Fälle bei ≥ 250 ; aber bei 0% mindestens in einen Quadranten ein TAC-Wert von 112 (s. Teil I). Ein TAC-Wert von 112 in mindestens einem Quadranten spricht allerdings in 72,7% der Fälle für eine PAX9-Mutation.

Familie V-AXIN2-1

Eine Tochter der Familie V-AXIN2-1 wurde behandelt. Die Probandin II:2 zeigt anamnestisch 19 Nichtanlagen mit einer TAC-Summe von 352 (TAC-Quadrantenwerte 110, 78, 55, 109) (Abb. 4.3.27) während bei ihrem älteren Bruder (II:1) alle Zähne angelegt sind. Bei der Mutter (I:1) und dem Vater (I:2) sind ebenso alle Zähne angelegt. Der Bruder der Mutter (I:3) ist nach dem Bericht der Familie oligodont, aber nicht kontaktierbar. Der Familienstammbaum ist in Abb. 4.3.28 dargestellt.

An der Studie nahmen die Probanden I:1, I:2, II:1, II:2 teil.



7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC		Summe
X	X		X	X	X			X	X	X			X	110	78	=352
	X	X		X	X	X	X	X	X			X	X	55	109	
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7			

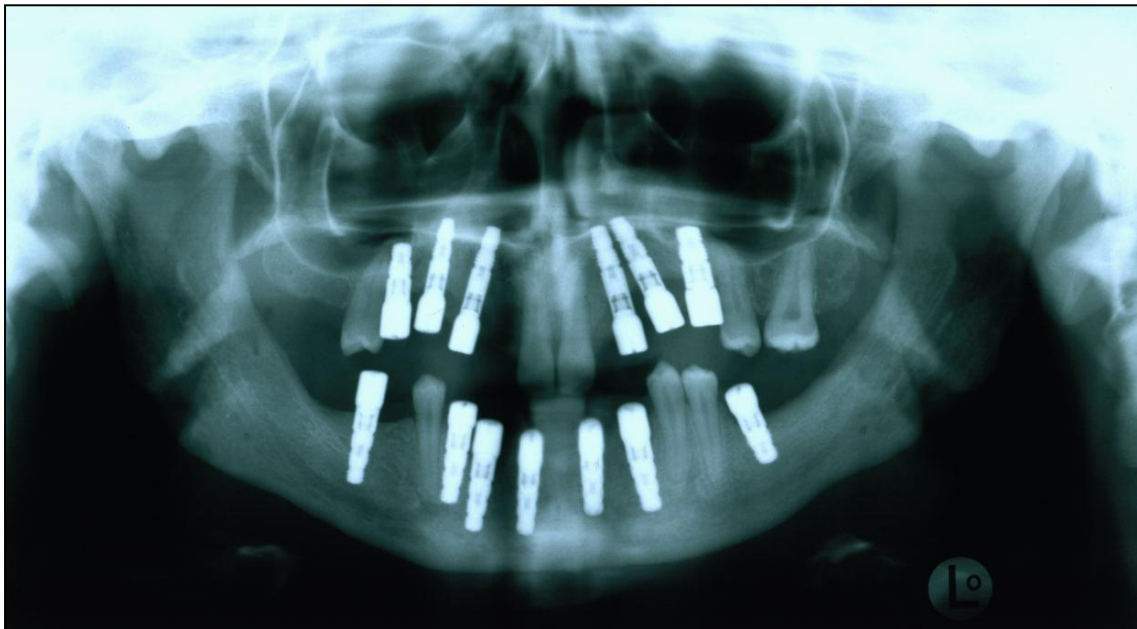


Abb. 4.3.27: Familie V-AXIN2-1. Proband II:2 im Alter von 18 bzw. 19 Jahren. Enface-Bild (18 Jahre), Orthopantomogramm (19 Jahre), FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

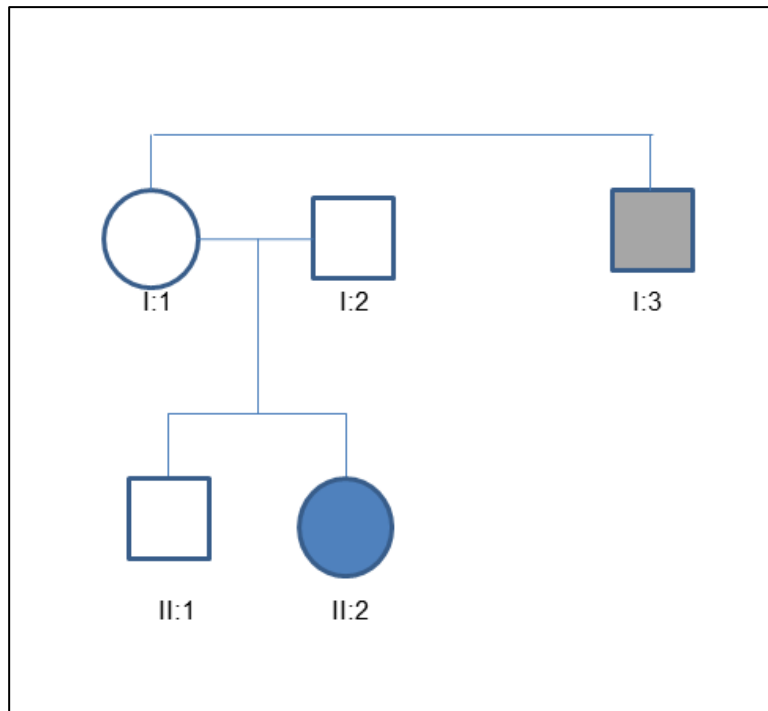
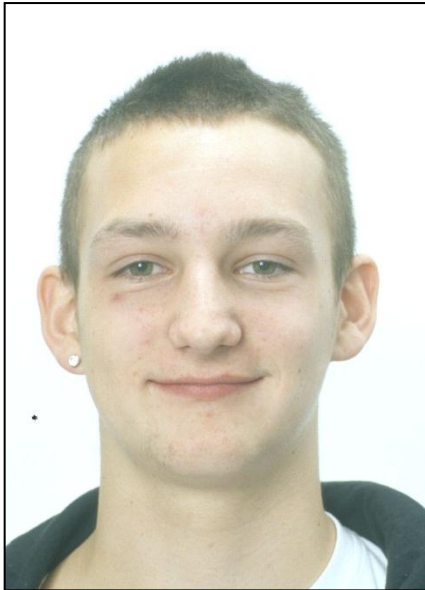


Abb. 4.3.28: Familienstammbaum der Familie V-AXIN2-1.

Familie V-AXIN2-2

Eine Tochter und ein Sohn der Familie V-AXIN2-2 wurden behandelt. Die Proband II:3 (Abb. 4.3.29) zeigte anamnestisch 17 Nichtanlagen mit einer TAC-Summe von 314 (TAC Quadrantenwerte 94, 78, 71, 71) während bei seiner ältesten Schwester (II:1) (4.3.30) fünf Zähne fehlen. Bei der Mutter (I:1), dem Vater (I:2) sowie bei der Schwester II:2 und dem Bruder II:4 sind alle Zähne angelegt. Der Familienstammbaum ist in Abb. 4.3.31 dargestellt.

An der Studie nahmen die Probanden I:2, II:2, II:3 und II:4 teil.



7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC		Summe
x		x	x	x	x				x	x	x		X	94	78	=314
x				x	x	x	x	x	x				x	71	71	
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7			



Abb. 4.3.29: Familie V-AXIN2-2. Proband II:3 im Alter von 18 Jahren. Enface-Bild, Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.



7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC	Summe
X													X	64	64
X							X						X	64	65
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7		



Abb. 4.3.30: Familie V-AXIN2-2. Proband II:1 im Alter von 10 bzw. 13 Jahren. Enface-Bild (13 Jahre), Orthopantomogramm (10 Jahre), FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

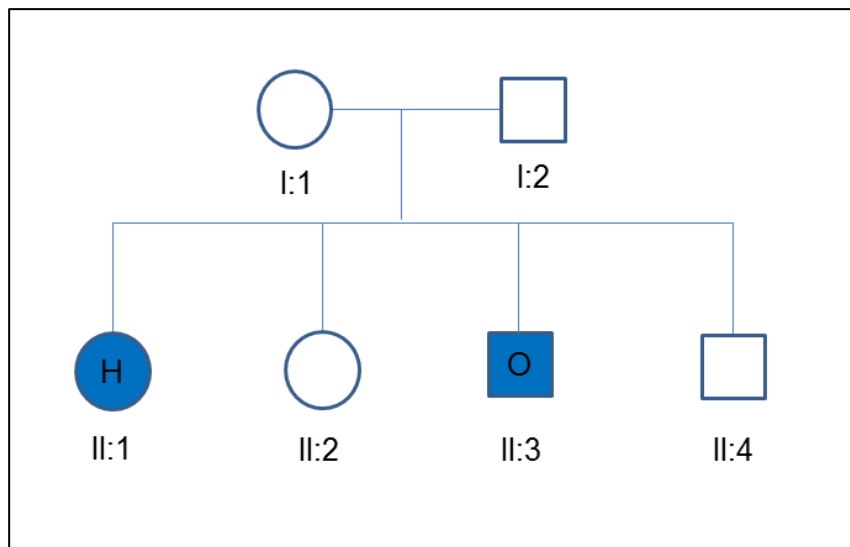


Abb. 4.3.31: Familienstammbaum der Familie V-AXIN2-2.

Familie V-AXIN2-3

Eine Tochter und ein Sohn der Familie V-AXIN2-3 wurden behandelt. Die Probandin III:1 (Abb. 4.3.32) zeigte anamnestisch neun Nichtanlagen mit einer TAC-Summe von 260 (TAC Quadrantenwerte 82, 18, 80, 80) während bei ihrem jüngeren Bruder (III:2) und auch bei der Mutter (II:1) alle Zähne angelegt sind. Bei dem Vater (II:1), bei seiner Schwester (II:3) und auch bei seiner Mutter (I:2) liegen ebenfalls Nichtanlagen vor. Bei der Mutter der Patientin (I:2) sind keine Nichtanlagen vorhanden. Der Familienstammbaum ist in Abb. 4.3.33 dargestellt.

An der Studie nahmen die Probanden I:1, II:1, II:2, II:3, III:1 und III:2 teil.



7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	TAC		Summe
X		X				X		X			X			82	18	=260
X		X									X		X	80	80	
7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7			



Abb. 4.3.32: Familie V-AXIN2-3. Proband II:1 im Alter von 12 Jahren. Enface-Bild, Orthopantomogramm, FDI-Schema, TAC-Quadrantenwerte sowie TAC-Summe sind angegeben.

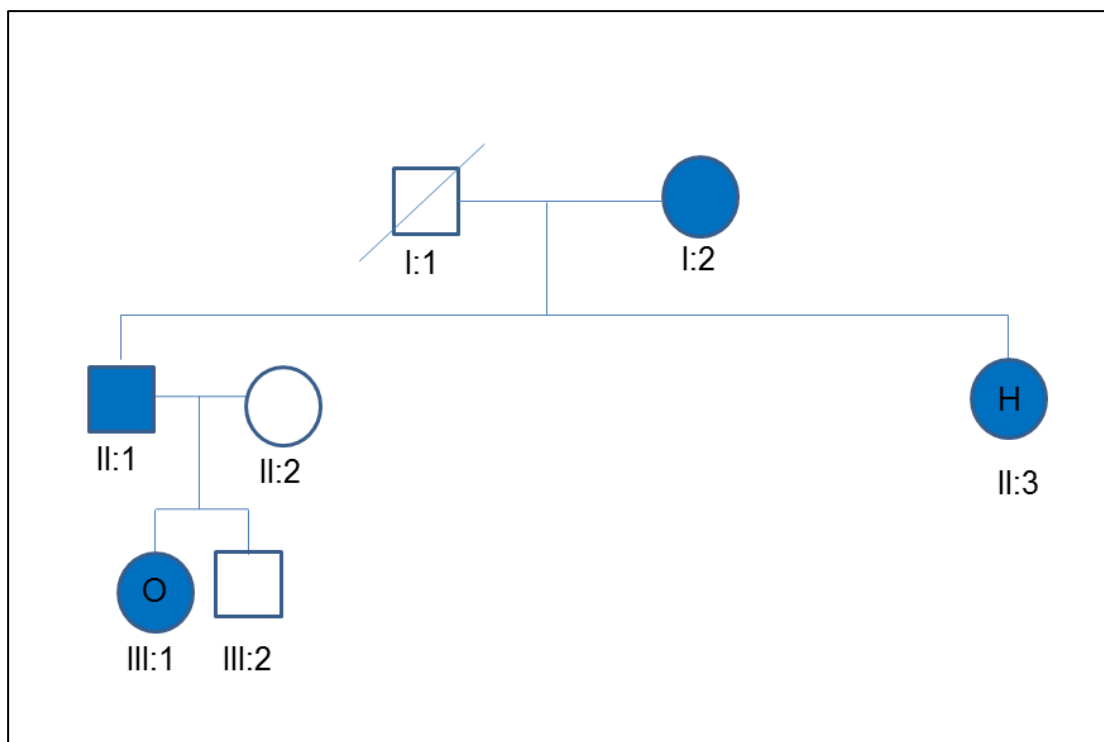


Abb. 4.3.33: Familienstammbaum der Familie V-AXIN2-3

5 Publikationsverzeichnis

5 Publikationsverzeichnis

5.1 Artikel

- 5.1.1 Ruf S, Klimas D, Hönemann M, Jabir S. Genetic background of nonsyndromic oligodontia: a systematic review and meta-analysis. *J Orofac Orthop.* 2013;74(4):295-308.
- 5.1.2 Ruiz-Heiland G, Jabir S, Wende W, Bock N, Ruf S. Novel mutation in the EDA gene associated with oligodontia. *J Orofac Orthop.*, submitted 2014

5.2 zitierfähige Abstracts

- 5.2.1 Jabir S, Bock N, Ruiz-Heiland G, Ruf S. Non-syndromic oligodontia—a risk marker for cancer?. *Eur J Orthod (2013) 35 (5): e3-e207.*
- 5.2.2 Ruiz-Heiland, Jabir S, Bock N, Nolte D, Ruf S. Identification of a novel mutation in the EDA gene associated with non-syndromic oligodontia. *Eur J Orthod (2014) 36 (5): e1-e244.*

5.3 Vorträge (V) und Poster (P)

- 5.3.1 V1: Jabir S, Bock N, Ruiz-Heiland G, Ruf S. Non-syndromic oligodontia – a risk marker for cancer? European Orthodontic Society Congress 26-29.06.2013, Reykjavic.
- 5.3.2 V2: Jabir S, Bock N, Ruiz-Heiland G, Ruf S. Non-syndromale Oligodontie – ein genetischer Risikomarker? Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kieferorthopädie 18.-22.09.2013, Stuttgart.

- 5.3.3 P1: Bock N, Jabir S, Ruiz-Heiland G, Ruf S. Non-syndromic oligodontia – a risk marker for cancer? Moyers Symposium 07.-08.03.2013, Ann Arbor.
- 5.3.4 P2: Ruiz-Heiland G, Jabir S, Bock N, Wende W, Nolte D, Ruf S. Identification of a novel mutation in the EDA gene associated with non-syndromic oligodontia. European Orthodontic Society Congress 18.-22.06.2014, Warschau.
- 5.3.5 P3: Bock N, Ruiz-Heiland G, Jabir S, Wende W, Nolte D, Ruf S. Nicht-syndromale Oligodontie: eine neue Punktmutation im EDA-Gen. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kieferorthopädie 10.-13.09.2014, München.

5.1 Artikel

5.1.1 Publikation: Genetischer Hintergrund nonsyndromaler Oligodontien – ein systematisches Review mit Metaanalyse

Ruf S, Klimas D, Hönemann M, Jabir S. Genetic background of nonsyndromic oligodontia: a systematic review and meta-analysis. *J Orofac Orthop.* 2013;74(4):295-308.

Genetic background of nonsyndromic oligodontia: a systematic review and meta-analysis

Genetischer Hintergrund nonsyndromaler Oligodontien – ein systematisches Review mit Metaanalyse

Sabine Ruf¹, Dana Klimas², Mario Hönemann³, Sarah Jabir¹

Abstract

Objectives. The goal of this work was to identify all known gene mutations that have been associated with the development of nonsyndromic oligodontia.

Methods.

A systematic literature search was performed electronically in two databases (PubMed, Medpilot) supplemented by a hand search. Articles published up to March 2012 were considered. Search terms were combined as follows: *oligodontia* and *genes*, *oligodontia* and *mutations*, *tooth agenesis* and *genes*, and *tooth agenesis* and *mutations*. A meta-analysis of the data was conducted based on the Tooth Agenesis Code (TAC).

Results. Seven genes are currently known to have a potential for causing nonsyndromic oligodontia. All these genes vary both in terms of number of identified mutations and in terms of number of documented patients: 33 mutations and 93 patients are on record for PAX9, 10 mutations and 51 patients for EDA, 12 mutations and 33 patients for MSX1, 6 mutations and 17 patients for AXIN2, and 1 mutation in 1 patient for EDARADD, NEMO, and KRT17 each. A total TAC score of 250 was found to have cutoff properties, as 100% of MSX1 and 80% of EDA patients exhibited TAC ≤ 250 , whereas 96.9% of PAX9 and 90% of AXIN2 patients exhibited TAC > 250 . Furthermore, 94.3% of EDA patients but only 28.6% of MSX1 patients exhibited odd-numbered TAC scores in at least one quadrant, and 72.7% of PAX9 but none of the AXIN2 patients were found to show TAC scores of 112 in at least one quadrant.

Conclusion. In order of decreasing frequency, PAX9, EDA, MSX1, AXIN2, EDARADD, NEMO, and KRT17 are the seven genes currently known to have a potential for causing nonsyndromic oligodontia. TAC scores enabled us to identify an association between oligodontia phenotypes and genotypes in the patients covered by this meta-analysis.

Zusammenfassung

Fragestellung Identifizierung aller bekannten Genmutationen, die mit der Entstehung nonsyndromaler Oligodontien assoziiert werden.

Methodik. Eine systematische elektronische Literatursuche bis einschließlich März 2012 wurde in zwei Datenbanken (PubMed, Medpilot) durchgeführt und durch eine Handsuche ergänzt. Folgende Suchbegriff-Kombinationen wurden verwendet: *oligodontia* and *genes*, *oligodontia* and *mutations*, *tooth agenesis* and *genes*, *tooth agenesis* and *mutations*. Auf der Grundlage des Tooth Agenesis Codes (TAC) wurde eine Metaanalyse der Daten durchgeführt.

Ergebnisse. Zwischen den sieben bisher bekannten Genen, die nonsyndromale Oligodontien verursachen können, variiert sowohl die Anzahl der identifizierten Mutationen (M) je Gen als auch die Anzahl der in der Literatur beschriebenen Patienten (P): PAX9 (33 M, 93 P), EDA (10M, 51P), MSX1 (12M, 33P), AXIN2 (6M, 17P), EDARADD, NEMO und KRT17 (je 1M/1P). Der TAC-Summenwert 250 besaß Trennwerteigenschaften: TAC ≤ 250 (100% MSX1- und 80% EDA-Patienten); TAC > 250 (96,9% PAX9- und 90% AXIN2-Patienten). Des Weiteren fand sich ein ungerader TAC-Wert in mindestens einem Quadranten bei 94,3% der EDA-Patienten, aber nur 28,6% der MSX1-Patienten. Ein TAC-Wert von 112 in mindestens einem Quadranten trat bei 72,7% der PAX9-, jedoch bei keinem der AXIN2 Patienten auf.

Schlussfolgerung. Bisher sind sieben Gene bekannt, die nonsyndromale Oligodontien verursachen können, dies sind in abnehmender Häufigkeit: PAX9, EDA, MSX1, AXIN2, EDARADD, NEMO und KRT17. Auf der Basis des Tooth Agenesis Codes (TAC) war innerhalb des Patientengutes der Metaanalyse ein Zusammenhang zwischen Oligodontie-Phänotyp und Genotyp darstellbar.

¹ Department of Orthodontics, Medical Center for Dental and Oral Medicine, Justus-Liebig-Universität Gießen, Germany

² München, Germany

³ Hilden, Germany

Received: May 16, 2012; accepted: November 2, 2012;
published online: June 29, 2013

J Orofac Orthop 2013; 74:295-308
DOI 10.1007/s00056-013-0138-z

Keywords

Oligodontia · Agenesis · Genes · Mutations

Schlüsselwörter

Oligodontie · Nichtanlagen · Gene · Mutationen

Introduction

Aplasia of permanent teeth is one of the most common dental anomalies in humans [41]. It may take the form of hypodontia, oligodontia, or anodontia [12]. While anodontia of the permanent dentition is unequivocally defined as complete absence of all permanent teeth, lack of a consistent distinction between hypodontia and oligodontia is a major obstacle when trying to compare studies in the literature. The definition of oligodontia by Schalk-van-der-Weide [60], i.e., agenesis of ≥ 6 permanent teeth other than third molars, has previously met with acceptance [4, 18, 60, 64] and has also been adopted for the present review. Available data about the prevalence of oligodontia also vary, ranging from 0.08–0.16% as reported by Rølling et al. [59] among Danish schoolchildren to 1.1% among a Caucasian population reported by Gábris et al. [18].

Tooth development is predominantly genetically controlled [70]. Over 200 genes are expressed during tooth development [71]. The most frequently reported genes associated with non-syndromic oligodontia are PAX9 (paired box gene 9), MSX1 (muscle segment homeobox 1), EDA (ectodysplasin A), and AXIN2 (axis inhibition protein 2) [11, 13, 14, 23, 36, 48]. Mutations of these genes have an impact on agenesis patterns, although in notably different ways. While PAX9 sequence alterations lead to agenesis mainly of molars [12, 13, 16, 25, 34, 49, 64], MSX1 mutations have been implicated primarily in congenitally missing premolars [29, 76]. Severe agenesis of both molars and premolars has been noted in patients with an AXIN2 mutation [35], whereas missing incisors are the chief manifestation of EDA-associated nonsyndromic oligodontia [5, 22, 47, 48, 63, 68].

It should be realized, however, that the agenesis patterns associated with all these genes are subject to considerable interindividual variation, and some of the aforementioned gene mutations will cause not only oligodontia but are also associated with other anomalies or an increased risk for cancer. Disturbances in MSX1 gene expression, for instance, are known to be involved in the development of cleft lip and cleft palate malformations [24] and have also been found to be associated with an increased risk of breast cancer [62]. EDA mutations are capable of causing not only nonsyndromic oligodontia [5, 47, 63, 68] but also ectodermal dysplasia [27]. Patients with AXIN2 gene defects are documented as having a predisposition for colorectal and breast cancers [35, 40].

Currently available studies about nonsyndromic oligodontia are purely descriptive and, as noted above, lack a uniform definition as to what constitutes oligodontia. It is, therefore, nearly impossible for clinicians to suspect specific gene mutations (genotype) behind specific patterns of oligodontia (phenotype). However, an ability to link phenotypes to genotypes would be reasonable taking into consideration the aforementioned back-

Einleitung

Aplasien von bleibenden Zähnen gehören zu den häufigsten dentalen Anomalien des Menschen [41], sie können in Form einer Hypodontie, einer Oligodontie oder einer Anodontie auftreten [12]. Während eine Anodontie der permanenten Dentition zweifelsfrei als komplettes Fehlen aller Zähne des bleibenden Gebisses definiert ist, wird die Differenzierung zwischen Hypodontie und Oligodontie nicht einheitlich gehandhabt, was den Literaturvergleich stark erschwert. Die in der aktuellen Literatur am ehesten anerkannte Definition, die auch für die vorliegende Publikation gilt, ist die Definition nach Schalk-van-der-Weide [60]. Danach liegt eine Oligodontie beim angeborenen Fehlen von sechs oder mehr bleibenden Zähnen, ausschließlich der Weisheitszähne, vor [4, 18, 60, 64]. Auch die Angaben zur Prävalenz der Oligodontie variieren in der Literatur. Während Rølling et al. [59] unter dänischen Schulkindern 0,08–0,16% mit Oligodontie fanden, beschreiben Gábris et al. [18] eine Prävalenz von 1,1% für eine kaukasische Population.

Die Zahnentwicklung ist überwiegend genetisch bestimmt [70]. Mehr als 200 Gene werden während der Zahnentwicklung exprimiert [71]. In der Literatur werden insbesondere Mutationen von vier Genen (Paired-Box-Gen 9= PAX9, Muscle segment homeobox-Protein 1= MSX1, Ektodysplasin-A = EDA, Axis inhibition Protein 2= AXIN2) im Zusammenhang mit non-syndromalen Oligodontien beschrieben [11, 13, 14, 23, 36, 48]. Ihre Auswirkungen auf die Dentition bzw. das Nichtanlagenmuster sind durchaus unterschiedlich. Während Veränderungen der PAX9-Gensequenz vorwiegend ein Fehlen von Molaren [12, 13, 16, 25, 34, 49, 64] bewirken, wird für MSX1-Mutationen vor allem ein Fehlen von Prämolaren [29, 76] beschrieben. Demgegenüber zeigen Patienten mit einer AXIN2-Mutation eine große Zahnunterzahl sowohl im Molaren- als auch im Prämolarenbereich [35]. Die EDA-assoziierten non-syndromalen Oligodontien äußern sich hingegen überwiegend durch ein Fehlen von Inzisiven [5, 22, 47, 48, 63, 68].

Jedoch gibt es unter allen beteiligten Genen eine nicht unerhebliche interindividuelle Variation hinsichtlich des Nichtanlagenmusters. Einige der oben genannten Genmutationen bewirken jedoch nicht nur das Auftreten von Oligodontien, sondern sind auch mit anderen Fehlbildungen oder einem erhöhtem Malignomrisiko assoziiert. So ist bekannt, dass Störungen in der MSX1-Gen-Expression an der Entstehung von Lippen-Kiefer-Gaumen(LKG)-Spalten beteiligt sind [24]. Ferner werden MSX1-Mutationen auch in Zusammenhang mit einem erhöhten Mammakarzinomrisiko gebracht [62]. EDA-Mutationen können neben non-syndromalen Oligodontien [5, 47, 63, 68] auch ektodermale Dysplasien (ED) verursachen [27]. Für Patienten mit AXIN2-Gendefekten ist ein vermehrtes Auftreten

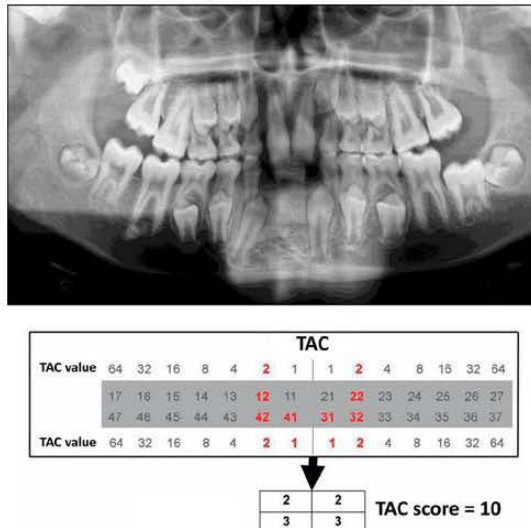


Figure 1. Tooth agenesis code (TAC) calculated in an exemplary case with agenesis of the teeth 12, 22, and 32–42. Each missing tooth is assigned a type-specific unique value (here 2 for each lateral and 1 for each central incisor). These values are added up for each quadrant. The sum of all four quadrants yields the total TAC score (in this case 10).

Abbildung 1. Tooth Agenesis Code (TAC): Berechnung am Beispiel eines Patienten mit Nichtanlage der Zähne 12, 22, 32–42. Jedem fehlenden Zahn wird der korrespondierende TAC-Wert zugeordnet, dies ist für den Beispielfall der Wert 2 für die seitlichen und der Wert 1 für die mittleren Schneidezähne. Anschließend werden die TAC-Werte innerhalb eines Quadranten addiert. Aus der Summe der TAC-Werte der vier Quadranten ergibt sich die TAC-Summe (im vorliegenden Fall 10).

ground of a predisposition for malignant diseases or the risk of anomalies in future generations. Although numerous web-based gene mutation databases (e.g., HGMD or OMIM) also contain information about mutations known to be associated with agenesis of teeth, the task of assigning genotypes to phenotypes is complicated by the lack of a uniform definition of oligodontia even at this level.

With these considerations in mind, the present systematic review and meta-analysis was performed to identify all mutations in the human genome that have been linked in previous publications to nonsyndromic oligodontia and to provide gene-specific details on the different patterns of agenesis involved.

Materials and methods

Two electronic databases (PubMed, Medpilot) were screened for articles published until March 2012. While the search was not restricted to specific languages, lack of appropriate translators led to the subsequent exclusion of articles in Slavic languages. Search terms were combined as follows: *oligodontia* and *genes*, *oligodontia* and *mutations*, *tooth agenesis* and *genes*, and *tooth agenesis* and *mutations*. An additional hand search

von kolorektalen Karzinomen und von Mammarkarzinomen beschrieben worden [35, 40].

Die bisher vorliegenden Publikationen zu non-syndromalen Oligodontien sind rein deskriptiven Charakters und verwenden, wie oben erwähnt, keine einheitliche Definition der Oligodontie. Daher ist es für den Kliniker bisher weitgehend unmöglich, ein bestimmtes Oligodontiemuster (Phänotyp) verdachtsweise mit einer bestimmten Genmutation (Genotyp) zu assoziieren, obwohl dies aufgrund des oben beschriebenen, möglicherweise erhöhten Risikos für Krebserkrankungen bzw. eines erhöhten Fehlbildungsrisikos für künftige Generationen durchaus sinnvoll wäre. Zwar gibt es derzeit zahlreiche Internetdatenbanken für Genmutationen (z.B. HGMD, OMIM), in denen auch Informationen zu den bekannten Mutationen im Zusammenhang mit Nichtanlagen von Zähnen verzeichnet sind, jedoch erschwert auch auf dieser Ebene die uneinheitliche Handhabung der Oligodontiedefinition die zweifelsfreie Zuordnung von Genotyp zu Phänotyp.

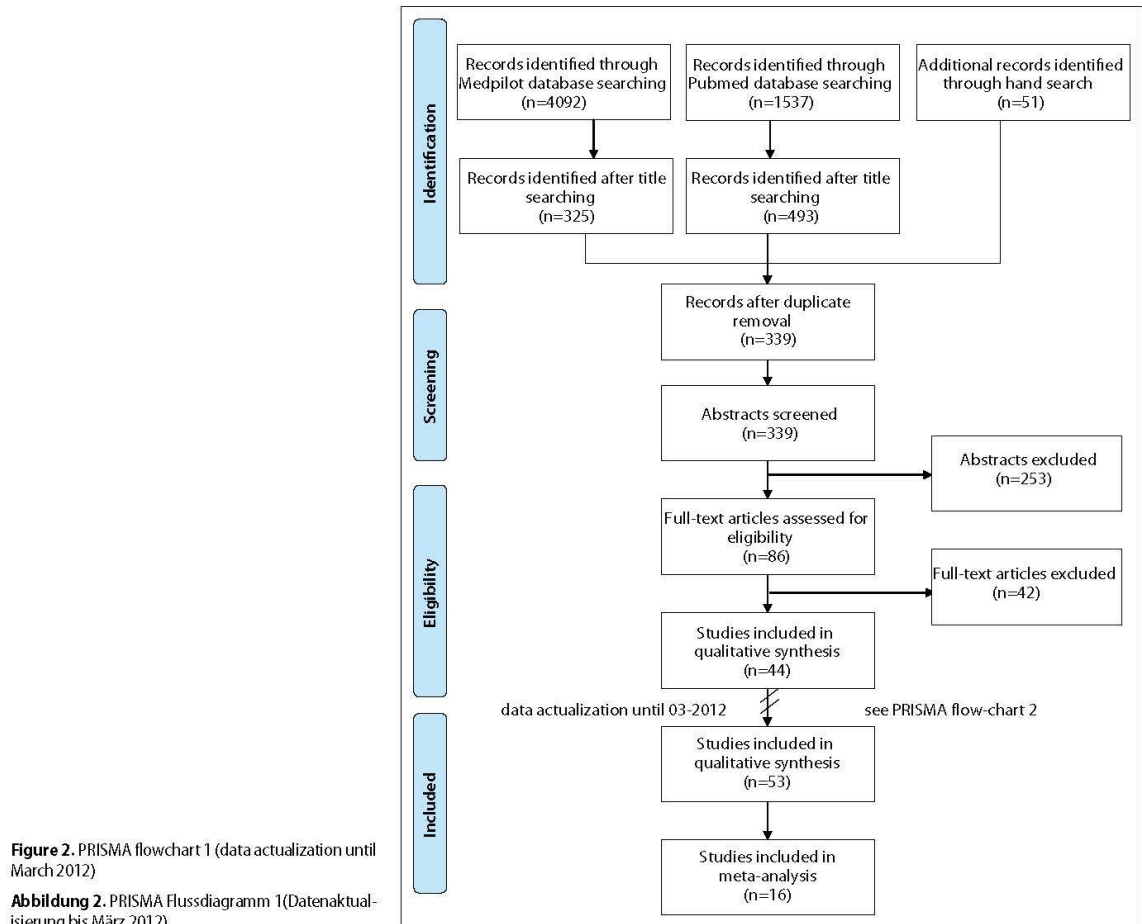
Daher war es Ziel des vorliegenden systematischen Reviews und der darauf aufbauenden Metaanalyse, alle in der Literatur beschriebenen Mutationen des menschlichen Genoms im Zusammenhang mit non-syndromalen Oligodontien zu identifizieren und die Nichtanlagen genspezifisch zu beschreiben.

Material und Methoden

Eine systematische elektronische Literatursuche wurde in zwei Datenbanken (PubMed, Medpilot) durchgeführt, wobei Publikationen bis März 2012 berücksichtigt wurden. Auch wenn primär keine Sprachlimitation angewandt wurde, erfolgte mangels Übersetzer später ein Ausschluss von Publikationen in slawischen Sprachen. Folgende Suchbegriffkombinationen wurden verwendet: *oligodontia* and *genes*, *oligodontia* and *mutations*, *tooth agenesis* and *genes*, *tooth agenesis* and *mutations*. Zusätzlich wurde eine Handsuche der kieferorthopädischen und molekularbiologischen Literatur sowie aller Referenzlisten der ausgewählten Artikel durchgeführt. Ein dreistufiges Auswahlverfahren (Titel → Abstract → Volltext) wurde unabhängig voneinander von allen vier Autoren durchgeführt. Nach jedem Schritt wurden die Fälle der Unstimmigkeit besprochen, bis ein Konsens erreicht war. Folgende Einschlusskriterien kamen zur Anwendung:

- humane In-vivo-Studien,
- non-syndromale Oligodontie (Nichtanlage von mindestens 6 permanenten Zähnen, Ausnahme: Weisheitszähne),
- Beschreibung der Anzahl der fehlenden Zähne (zwingend erkennbarer Ausschluss der Weisheitszähne) und
- durchgeführte genetische Analyse.

Im nächsten Schritt wurde eine Metaanalyse durchgeführt. Im Gegensatz zum systematischen Review, wo die Angabe der Anzahl der Nichtanlagen seitens der Autoren genügte, mussten bei der Metaanalyse die nicht angelegten Zähne durch ein abgebildetes Orthopantomogramm, ein dargestelltes Zahnschema oder die zahnspezifische Auflistung zweifelsfrei zu ve-



covered the orthodontic and molecular biology literature and all reference lists of the selected articles. Publications were selected by all four authors independently of each other in a three-step process (title → abstract → full text). Each step was followed by discussing points of disagreement until consensus was reached. Articles were only considered if they reported on

- human in vivo studies dealing with nonsyndromic oligodontia (defined as agenesis of ≥ 6 permanent teeth other than third molars),
- included details about the number of congenitally missing teeth (with clearly identifiable exclusion of wisdom teeth), and
- genetic analysis.

A meta-analysis was performed next, this time using more restrictive inclusion criteria than for the systematic review. While the latter had included any studies containing information about the number of congenitally missing teeth, each

rifizieren sein. Darüber hinaus kamen folgende zusätzliche Einschlusskriterien zur Anwendung:

- durchgeführte Linkage-Analyse,
- normale (nicht-oligodonte) Patientenkontrollgruppe und
- Nachweis einer funktionellen Mutation.

Zur Auswertung und zum Vergleich der genspezifischen Phänotypen wurden die Nichtanlagedaten der eingeschlossenen Publikationen mit Hilfe des Tooth Agenesis Code (TAC) [74] ausgewertet. Der TAC ist ein numerischer Code der die Anzahl und die genaue Position nicht angelegter Zähne für jeden Quadranten beschreibt (Abbildung 1).

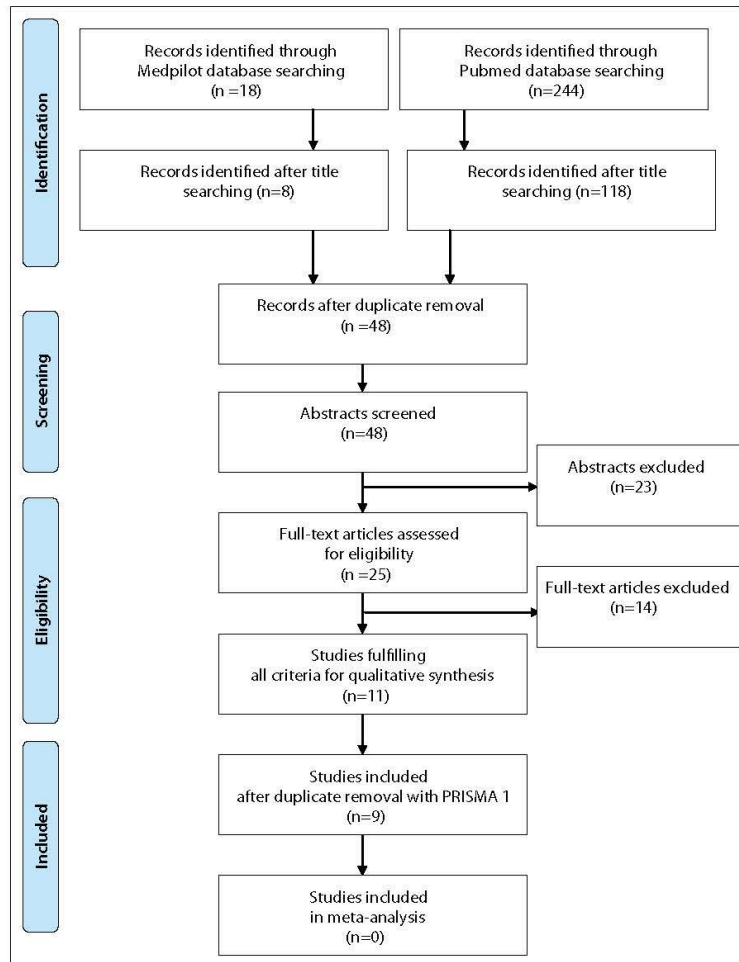


Figure 3. PRISMA flowchart 2 (data actualization until March 2012)

Abbildung 3. PRISMA Flussdiagramm 2 (Datenaktualisierung bis März 2012)

study included in the meta-analysis had to offer a clear basis to obtain confirmation for all specifically congenitally missing teeth (i.e., an orthopantomogram, a dental chart, or a detailed listing of teeth). Furthermore, only studies were considered that included a linkage analysis, a control group of normal patients without oligodontia, and demonstration of a functional mutation. The Tooth Agenesis Code (TAC)—a numerical score system detailing the number and exact position of congenitally missing teeth in each quadrant—was used to analyze and compare the gene-specific phenotypes of the agenesis cases reported in the various studies (Figure 1; [74]).

Results

Systematic literature review to identify gene mutations

The review was conducted in accordance with the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-

Ergebnisse

Systematische Literaturübersicht zur Identifizierung von Genmutationen

Die einzelnen Schritte des Auswahlverfahrens sind in zwei Flussdiagrammen gemäß der Richtlinie des PRISMA-Statements [43] dargestellt (Abbildung 2, Abbildung 3). Die Hauptgründe für den Ausschluss von Abstracts bzw. Artikeln bestanden darin, dass 1) die Patienten mit Oligodontie auch Zeichen und Symptome anderer betroffener Strukturen zeigten und somit syndromal waren, 2) weniger als sechs Zähne (ausschließlich Weisheitszähne) fehlten, 3) keine neuen Daten präsentiert waren oder 4) keine genetische Analyse durchgeführt worden war. Insgesamt wurden 53 Artikel in die Analyse eingeschlossen. Von diesen erfüllten 6 Studien zwar alle Einschlusskriterien des systematischen Reviews, wurden aber dennoch nicht ausgewertet, da sie entweder bei keinem Pa-

Table 1. Results of the systematic literature review for gene mutations associated with nonsyndromic oligodontia

Tabelle 1. Ergebnisse der systematischen Literaturübersicht zu Genmutationen im Zusammenhang mit nonsyndromalen Oligodontien

Identified genes	Mutations (n)	Patients (n)	References
PAX9	33	93	[1, 6, 12, 13, 16, 23, 25, 26, 30, 34, 38, 42, 44, 45, 49, 54, 64, 65, 67, 78, 80, 82, 83, 85]
MSX1	12	33	[6, 11, 14, 29, 39, 46, 53, 75, 81]
EDA	10	51	[5, 22, 37, 47, 48, 56, 63, 68, 69]
AXIN2	6	17	[6, 35, 40]
Put/PAX9	1	7	[42]
EDARADD	1	1	[6]
NEMO	1	1	[32]
KRT17	1	1	[19]

AXIN2 axis inhibition protein 2, *EDA* ectodysplasin A, *EDARADD* EDAR-associated death domain gene, *KRT17* keratin, type I cytoskeletal 17, *MSX1* muscle segment homeobox 1, *NEMO* NF-kappa-B essential modulator, *PAX9* paired box gene 9, *Put/PAX9* putative PAX9 promoter

Analyses) statement. Two flow charts are provided to outline the selection process (Figure 2, Figure 3). Most of the excluded abstracts and articles (1) dealt with patients who were considered syndromic as they showed additional signs and symptoms other than oligodontia or (2) had fewer than six congenitally missing teeth other than third molars, included (3) no new data, and/or (4) no genetic analysis. A total of 53 articles were included in the analysis. Six of these met all inclusion criteria but were not evaluated either because they had failed to demonstrate gene mutations in any of the patients [15, 20, 55, 58, 66] or because an alteration had been identified on chromosome 16q12.1 without giving details [2].

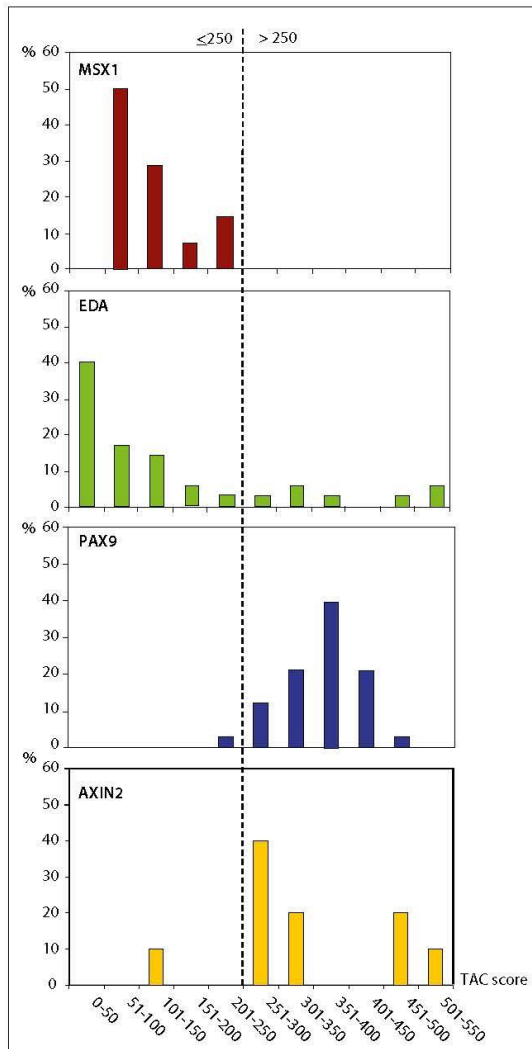
The remaining 47 studies disclosed that seven genes are currently known to have a potential for causing nonsyndromic oligodontia: PAX9 (paired box gene 9), MSX1 (muscle segment homeobox 1), EDA (ectodysplasin A), AXIN2 (axis inhibition protein), NEMO (NF-kappa-B essential modulator), KRT17 (keratin 17), and EDARADD (EDAR-associated death domain). In addition, one report described a mutation in a putative PAX9 promoter region. A summary of these genes along with the number of reported mutations and patients is given in Table 1. There is great variation between both the number of identified mutations and the number of patients reported for each gene. The PAX9 gene has the highest rate of mutations, with 33 known gene variants and detailed reports on 93 oligodontia patients. The MSX1 and EDA genes exhibit 12 or 10 gene variants with 33 or 51 oligodontia patients, respectively. Considerably fewer mutations have been reported for AXIN2 (6 gene variants, 17 patients). EDARADD, NEMO, and KRT17 are on record with only 1 gene variant in 1 patient each. One mutation in 7 patients is documented for the putative PAX9 promoter region.

However, not all reported cases had an identifiable genetic background. As noted above, five studies included oligodontia patients but were not able to identify associated gene mutations [15, 20, 55, 58, 66]. Another eight studies reported no associated mutations in some patients [3, 6, 21, 49, 53, 54, 63, 85]. Overall, mutations were not detected in 53 patients, accounting for

tienten Genmutationen nachweisen konnten [15, 20, 55, 58, 66] bzw. nur eine nicht näher beschriebene Genveränderung auf dem Chromosom 16q12.1 festgestellt wurde [2].

Bei den verbleibenden 47 Studien zeigte sich, dass bisher 7 Gene bekannt sind, die non-syndromale Oligodontien verursachen können (Tabelle 1): Paired-Box-Gen 9= PAX9, Muscle segment homeobox-Protein 1= MSX1, Ektodysplasin-A = EDA, Axis inhibition Protein 2= AXIN2, NF-kB-essential modulator-Protein = NEMO, Keratin 17= KRT17 und EDAR-associated death domain gene = EDARADD. Weiterhin ist eine Mutation in einer möglichen PAX9-Promotorregion in einem Artikel beschrieben worden. Sowohl die Anzahl der identifizierten Mutationen je Gen als auch die Anzahl der in der Literatur beschriebenen Patienten variiert stark zwischen den Genen. Das PAX9-Gen hat die höchste Mutationsrate mit 33 bekannten Genvarianten und 93 detailliert beschriebenen Oligodontie-Patienten. Die MSX1- und EDA-Gene zeigen 12 beziehungsweise 10 Genvarianten mit 33 beziehungsweise 51 Oligodontiepatienten. Deutlich seltener treten AXIN2-Mutationen (6 Genvarianten, 17 Patienten), EDARADD-Mutationen und NEMO- sowie KRT17-Mutationen (je eine Genvariante und je ein Patient) auf. Für die mögliche PAX9-Promotorregion ist eine Mutation mit 7 Patienten beschrieben.

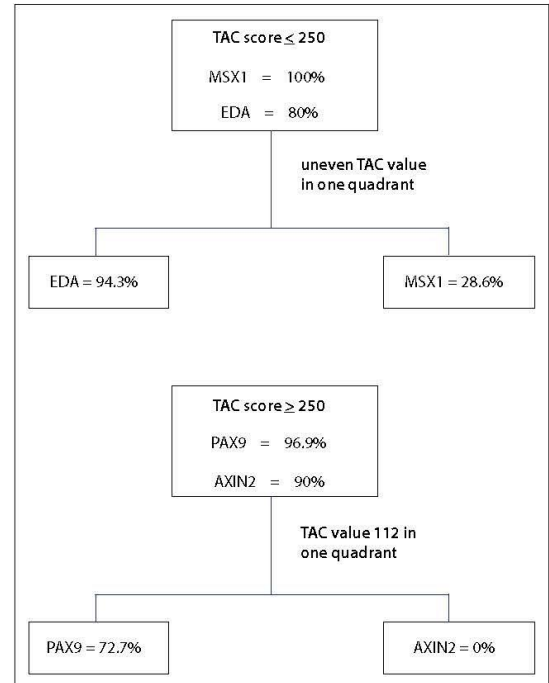
Doch nicht für alle in der Literatur beschriebenen Patienten war ein genetischer Hintergrund identifizierbar. Wie oben beschrieben wurden in 5 Studien [15, 20, 55, 58, 66] bei keinem der untersuchten Patienten oligodontieassoziierte Genmutationen nachgewiesen. In acht weiteren Studien [3, 6, 21, 49, 53, 54, 63, 85] war dies bei einigen der untersuchten Patienten der Fall. Dies betraf insgesamt 53 Patienten bzw. 15,5% aller in der Literatur beschriebenen Oligodontiepatienten (n=343), bei denen eine genetische Analyse durchgeführt worden ist. Bei der Mehrzahl derjenigen Studien die ganz oder teilweise keine Mutationen feststellen konnten, waren ausschließlich isolierte Sequenzierungen von Einzelgenen durchgeführt worden.



15.5% of all genetically analyzed oligodontia cases reported in the literature ($n=343$). The majority of all studies reporting non-detectable mutations did so exclusively based on isolated sequencing of individual genes.

Meta-analysis linking phenotypes to genotypes

Meta-analysis was performed to see whether specific phenotypes could be linked to specific genotypes. Of the 47 studies included in the systematic review, 31 studies did not meet the additional inclusion criteria for meta-analysis. Among them were 3 studies respectively 3 genes (NEMO, KRT17, EDAR-ADD) deemed inappropriate for statistical analysis as they reported on only 1 patient each [6, 19, 32]. Also excluded were the cases with mutations in the putative PAX9 promoter re-



▲ **Figure 5.** Results of the meta-analysis: association between phenotype and genotype. Frequency (%) of the discriminative TAC score (250) and the modal quadrant values (uneven TAC or TAC-Value 112) in patients with MSX1, EDA, PAX9, and AXIN2 mutations

Abbildung 5. Ergebnisse der Meta-Analyse: Assoziation zwischen Phänotyp und Genotyp. Häufigkeit (%) der TAC-Trennwertes (250) und der Quadrantenmodalwerte (ungerader TAC bzw. TAC-Wert 112) bei Patienten mit MSX1, EDA, PAX9- und AXIN2-Mutationen

◀ **Figure 4.** Results of the meta-analysis: frequency (%) distribution of TAC scores in patients with MSX1, EDA, PAX9, and AXIN2 gene mutations. The discriminating TAC score of 250 is indicated as a dotted line

Abbildung 4. Ergebnisse der Metaanalyse: Häufigkeitsverteilung (%) der TAC-Summen bei Patienten mit MSX1, EDA, PAX9 und AXIN2 Genmutationen. Die Trennwert-TAC-Summe 250 ist als gestrichelte Linie dargestellt

Metaanalyse zur Assoziation zwischen Genotyp und Phänotyp

Ziel der Metaanalyse war es zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen Phäno- und Genotyp nachweisbar ist. Von den 47 Studien, die im systematischen Review Berücksichtigung fanden, wurden aufgrund der zusätzlichen Einschlusskriterien 31 Studien nicht in die Metaanalyse einbezogen. Ausgeschlossen wurden dabei drei Gene (NEMO, KRT17, EDAR-ADD), für die jeweils nur ein einziger oligodonter Patient in der Literatur beschrieben ist [6, 19, 32], weshalb eine statistische Analyse per se nicht sinnvoll ist. Außerdem erfolgte keine weitere Analyse der Patienten mit Mutationen in der möglichen PAX9 Promotorregion [42], da es sich nur um Mitglieder einer einzigen Familie handelte, was eine mögliche Extrapolation

gion [42], because all these patients were members of the same family which would have called any extrapolation to the general population greatly into question. Thus, 15 studies including 33 PAX9, 14 MSX1, 35 EDA, and 10 AXIN2 cases remained for meta-analysis [5, 11, 13, 16, 22, 23, 35, 37, 39, 45, 56, 64, 68, 69, 75]. All these patients happened to show familial inheritance of oligodontia, the only exception being a single patient with a spontaneous de novo mutation of the AXIN2 gene reported by Lammi et al. [35].

The total TAC scores of all four quadrants per patient revealed that the percentage distribution of specific values clearly differed between the four genes analyzed (Figure 4). Furthermore, they were empirically found to have cutoff properties at ≤ 250 versus >250 based on the patients covered by this meta-analysis (Figure 5). All patients with MSX1 and 80% of those with EDA mutations showed total TAC scores below 250, whereas values higher than 250 were found in 96.9% of patients with PAX9 and in 90% of those with AXIN2 mutations. The modal TAC value per quadrant indicated additional differences in distribution between the various genes (Figure 5). Odd-numbered TAC scores in at least one quadrant were seen in 94.3% of EDA compared to only 28.6% of MSX1 patients, while 72.7% of PAX9 compared to none of the AXIN2 patients exhibited TAC values of 112 in at least one quadrant. The individual TAC values of all patients included in the meta-analysis are available from the authors.

Discussion

This systematic review was performed in accordance with the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) statement [43]. Due to restrictive exclusion criteria, only 53 studies were included in the review and only 15 in the meta-analysis. Traditionally, a clear line has been drawn between both essential forms of oligodontia, one being part of a syndrome and the other one occurring in isolation. Nowadays, however, the view is becoming prevalent that both forms might just represent different severities of specific gene alterations. Mues et al. [48] showed that while EDA mutations causing nonsyndromic oligodontia involved only a reduced expression, receptor binding or signal intensity of the mutated EDA1 protein, those causing syndromic disease were characterized by a total loss of protein function.

The present study was nevertheless strictly confined to non-syndromic patients who appeared perfectly healthy aside from their oligodontia, as this makes them especially interesting from a prevention and screening perspective. Similar to the blurred line between nonsyndromic and syndromic forms of disease, the transition between hypodontia and oligodontia is naturally smooth and basically a question of definition. The rationale of confining this study to oligodontia patients was the assumption that in case of ≥ 6 congenitally missing permanent teeth other than third molars [60], a significant loss of function of the mutated protein with potentially more far-reaching consequences can be expected.

tion auf die Grundgesamtheit prinzipiell stark in Frage gestellt hätte. Somit konnten 15 Studien [5, 11, 13, 16, 22, 23, 35, 37, 39, 45, 56, 64, 68, 69, 75] mit insgesamt 33 PAX9-, 14 MSX1-, 35 EDA- und 10 AXIN2-Patienten im Rahmen der Metaanalyse ausgewertet werden. Mit nur einer Ausnahme wiesen alle in der Metaanalyse berücksichtigten Patienten per Zufall einen familiären Erbgang der Oligodontie auf. Der einzige Patient mit einer spontanen, De-novo-Mutation entstammte der Studie von Lammi et al. [35] und wies eine AXIN2-Mutation auf.

Bei der Ermittlung der TAC-Summe aller vier Quadranten zeigte sich, dass die prozentuale Häufigkeit bestimmter TAC-Summen deutlich zwischen den vier analysierten Genen variierte (Abbildung 4). Ferner wurde deutlich, dass der empirisch ermittelte TAC-Summenwert 250 für das untersuchte Patientengut Trennwerteigenschaften besitzt (Abbildung 5). Bei 100% der Patienten mit MSX1-Mutationen und 80% der Patienten mit EDA-Mutationen lagen die TAC-Summen-Werte unterhalb von 250, während bei 96,9% der Patienten mit PAX9-Mutationen und 90% der Patienten mit AXIN2-Mutationen Werte über 250 auftraten. Außerdem fanden sich Unterschiede hinsichtlich der TAC-Quadrantenmodalwerte zwischen den Genen (Abbildung 5). Ein ungerader TAC-Wert in mindestens einem Quadranten zeigte sich bei 94,3% der EDA-Patienten aber nur bei 28,6% der MSX1-Patienten. Ferner kam ein TAC-Wert von 112 in mindestens einem Quadranten bei 72,7% der PAX9-Patienten, jedoch bei keinem der AXIN2 Patienten vor. Die individuellen TAC-Werte aller in die Metaanalyse eingeschlossenen Patienten sind über die Autoren erhältlich.

Diskussion

Das vorliegende systematische Review wurde nach den Richtlinien des PRISMA-Statements [43] durchgeführt. Aufgrund strikter Ausschlusskriterien konnten nur 53 Studien für das Review und 15 für die Metaanalyse verwendet werden. Grundsätzlich kann eine Oligodontie als isolierte, non-syndromale Form oder als Teil eines Syndroms vorkommen. Während man früher streng zwischen den syndromalen und non-syndromalen Formen trennte, setzt sich heute vermehrt die Meinung durch, dass es sich möglicherweise nur um unterschiedliche Schweregrade genetischer Veränderungen handelt. So konnten Mues et al. [48] zeigen, dass bei EDA-Mutationen die non-syndromale Oligodontien verursachen, die Expression, Rezeptorbindung oder Signalstärke des mutierten EDA1-Proteins lediglich herabgesetzt war, während die Proteinfunktion bei syndromalen Oligodontien völlig fehlte.

Dennoch wurden in die vorliegende Studie ausschließlich non-syndromale Patienten eingeschlossen, weil diese abgesehen von der Oligodontie völlig gesund erschienen und somit unter Präventions- und Screeningaspekten besonders interessant sind. Analog zum fließenden Übergang zwischen non-syndromalen und syndromalen Formen einer Erkrankung ist naturgemäß auch der Übergang zwischen Hypo- und Oligodontie fließend und genau genommen nur definitionsbedingt. Es wurden dennoch ausschließlich oligodonte Patienten eingeschlos-

As a possible disadvantage of our restrictive inclusion criteria, the number of new genes uncovered by the present review was small. Besides the previously known involvement of PAX9, MSX1, EDA, AXIN2, cases of nonsyndromic oligodontia were also found to be associated with EDARADD, NEMO, and KRT17. Furthermore, a link of oligodontia to mutations in a putative PAX9 promoter region is suspected. To put things in perspective, a role of EDARADD, NEMO, and KRT17 has merely been reported in isolated cases of one patient each [6, 19, 32]. Clearly, the list of genes in this review is still not exhaustive and will continue to grow in the coming years, not least because a number of studies in which hypodontia and oligodontia were not distinguished have revealed involvement of other genes such as TGFA [9], WNT-10 [8], or LTBP3 [50].

Although the TAC [74] does not give any truly new information about the congenitally missing teeth in individuals or patients with specific genotypes, it does make the information clearer and more easy to structure in comparison with the purely descriptive data in the literature. The high total scores (>250) identified for patients with PAX9 and AXIN2 mutations confirm reports that the former give rise primarily to missing molars [12, 13, 16, 25, 34, 48, 63] and the latter to severe agenesis of both molars and premolars [35]. Unlike the descriptive data, however, those of our meta-analysis distinguished between both genotypes acceptably well, as 72.7% of PAX9 but none of the AXIN2 patients revealed TAC scores of 112 (reflecting agenesis of the first and second molars and the second premolar) in at least one quadrant.

The lower range of total TAC scores (≤ 250) was also found to confirm descriptive data in the literature, in that MSX1 mutations are mainly associated with missing premolars [29, 75] and that cases of nonsyndromic oligodontia related to the EDA gene are characterized by agenesis of central incisors [5, 22, 47, 48, 61, 66]. However, the agenesis patterns associated with all these genes vary considerably between individuals, one documented example being agenesis of permanent incisors even in the presence of PAX9 mutations [6]. Our meta-analysis, however, acceptably separated the genotypes when the total TAC scores of all four quadrants were combined with findings of odd-numbered TAC scores (expressing agenesis of a central incisor) in at least one quadrant, as 94.3% of EDA patients but only 28.6% of MSX1 patients congenitally lacked at least one central incisor.

It is not possible to judge at this time whether, and to what extent, the results of this meta-analysis can be extrapolated to all cases of oligodontia in the general population. Further studies are needed to address this question, particularly with regard to the observed association between oligodontia phenotypes and genotypes. A limiting factor not to be ignored is that our meta-analysis was coincidentally almost exclusively based on patients with familial oligodontia. Bergendal et al. [6] investigated a sample of 93 oligodontia patients not selected for familial genesis and, in effect, identified gene mutations in only 11% of cases. While this finding would not support the notion of phenotypes being strongly associated with genotypes, one reason may have been, as stated in the discussion by the authors themselves, that

sen, da bei einem definitionsentsprechenden Fehlen [60] von sechs oder mehr bleibenden Zähnen ausschließlich der Weisheitszähne von einem deutlichen Funktionsverlust der mutierten Proteine auszugehen ist, der möglicherweise weiter reichen Folgen hat.

Als möglicher Nachteil der strikten Einschlusskriterien ist zu sehen, dass das vorliegende systematische Review nur wenige neue Gene aufdecken konnte. So zeigte sich, dass neben den bekannten Genen PAX9, MSX1, EDA, AXIN2 auch EDARADD, NEMO und KRT17 an der Entstehung von non-syndromalen Oligodontien beteiligt sind. Ebenso besteht der Verdacht, dass Mutationen in einer möglichen PAX9-Promotorregion in Zusammenhang mit Oligodontien stehen. Jedoch ist für EDARADD, für NEMO und auch für KRT17 nur je ein einziger Patient in der Literatur beschrieben worden [6, 19, 32]. Sicher ist die Liste dieser Gene nicht abschließend und wird sich in den kommenden Jahren weiter erhöhen, zumal in einigen Studien, in denen keine Differenzierung zwischen Hypodontie und Oligodontie vorgenommen wurde, andere Genbeteiligungen aufgedeckt wurden: TGFA [9], WNT-10 [8], LTBP3 [50].

Auch wenn die Anwendung des TAC [74] keine grundsätzlich neue Information hinsichtlich der nichtangelegten Zähne bei einem Individuum bzw. bei Patienten eines speziellen Genotyps liefert, so macht er die Information dennoch klarer und strukturierbarer als die bisher in der Literatur vorliegenden rein deskriptiven Daten. Die hohen TAC-Summen >250 für die Patienten mit PAX9- und AXIN2-Mutationen bestätigen die Beschreibungen in der Literatur, dass Veränderungen der PAX9-Gensequenz vorwiegend ein Fehlen von Molaren [12, 13, 16, 25, 34, 48, 63] und AXIN2-Mutationen eine große Zahnunterzahl sowohl im Molaren- als auch im Prämolarenbereich [35] zur Folge haben. Der im vorliegenden Patientengut identifizierte PAX9-charakteristische TAC-Quadranten-Wert von 112, der einer Nichtanlage des ersten und zweiten Molaren sowie des zweiten Prämolaren entspricht, gestattete jedoch im Gegensatz zur deskriptiven Form eine akzeptable Differenzierung zwischen den beiden Genotypen, da er bei 72,7% der PAX9-Patienten, jedoch bei keinem der AXIN2-Patienten vorkam.

Auf der anderen Seite bestätigen auch die niedrigen TAC-Summen ≤ 250 die deskriptiven Daten in der Literatur, dass bei MSX1-Mutationen vor allem Prämolaren fehlen [29, 75] und EDA-assoziierte non-syndromale Oligodontien durch ein Fehlen von zentralen Inzisiven charakterisiert sind [5, 22, 47, 48, 61, 66]. Jedoch gibt es unter allen beteiligten Genen eine nicht unerhebliche interindividuelle Nichtanlagenvariation. So können beispielsweise auch bei PAX9-Mutationen bleibende Inzisiven fehlen [6]. Durch die Kombination von TAC-Summe und EDA-charakteristischem ungeraden TAC-Quadrantenwert, der die Nichtanlage eines mittleren Schneidezahnes zum Ausdruck bringt, war aber im vorliegenden Patientengut eine befriedigende Trennung zwischen den Genotypen möglich. So fehlte bei 94,3% der EDA-Patienten ein zentraler Inzisivus in mindestens einem Quadranten, während dies nur auf 28,6% der MSX1-Patienten zutraf.

their sample did not include enough patients with the same type of mutations.

Despite this current lack of conclusive scientific evidence for an actual association between oligodontia genotypes and phenotypes, orthodontists should be aware of their medical responsibility in this regard. Unlike other abnormalities, like those seen in association with mild ectodermal dysplasia, congenitally missing teeth are a very straightforward ectodermal manifestation whose diagnosis is unambiguous. The fact is that only around one-third of oligodontia patients referred to dental care facilities will arrive there with an established diagnosis of being syndromic [61], whereas two-thirds of the same patients are known to show extraoral ectodermal signs affecting their hair, nails, or sweat glands [51]. Identifying patients with low-level manifestations/microsymptoms and as such genetic risk patients could, thus, be greatly facilitated through extended orthodontic diagnostics and, most importantly, by an increased vigilance for related signs and symptoms.

As the relative frequency of oligodontia cases that have been associated with specific genes varies considerably, it is reasonable to assume that orthodontists will be faced with different genotypes to varying extents in daily clinical practice. The PAX9 gene is associated with both the highest rate of known mutations (33 variants) and the largest number of detailed reports on oligodontia cases (93 patients), which have exclusively presented as nonsyndromic disease [23, 45, 49]. Hence, for all we know, patients of the PAX9 type do not have an increased risk of syndromic diseases or abnormalities other than oligodontia. Mutations of the EDA gene appear to be the second most common cause, with 10 documented variants of the gene in a total of 51 oligodontia patients. EDA mutations are capable of causing not only nonsyndromic oligodontia [5, 47, 63, 68] but also ectodermal dysplasia [27], a heterogeneous genetic disease that may affect any structures of the outer cell germ layer (i.e., the ectoderm) like hair, nails, teeth, skin, and sweat glands to varying degrees and, in its completely manifested form, may lead to hypohidrotic or anhidrotic ectodermal dysplasia syndrome [17, 31, 48, 57].

In infancy and early childhood—due to the reduced ability of these patients to secrete sweat—this can potentially give rise to life-threatening hyperthermia with resultant cerebral damage or sudden infant death [33, 72]. As infant mortality continues to be clearly increased to this day [31] with a reported rate of 28% among male infants affected [52], early diagnosis in the neonatal stage is essential. Frequently, however, the decisive pointers leading to the eventual diagnosis of ectodermal dysplasia are tooth agenesis or hypotrichosis at the age of 2–3 years [77]. Men are more severely affected than women due to the X-chromosomal inheritance, i.e., the manifestations in women are commonly mild, as by taking the form of nonsyndromic oligodontia [28, 48]. It is, therefore, important that notably women with nonsyndromic oligodontia are identified as potential carriers of ectodermal dysplasia [7] to facilitate diagnosis in descendant generations and to initiate appropriate steps in infants. In addition, orthodontists faced with the usually unavoidable need for

Ob und inwiefern sich die Ergebnisse dieser Metaanalyse auf die Allgemeinheit bzw. die Gesamtpopulation der Patienten mit Oligodontien übertragen lassen, ist derzeit nicht beurteilbar und muss im Rahmen weiterführender Studien untersucht werden. Dies gilt vor allem für den beobachteten Zusammenhang zwischen dem Oligodontie-Phänotyp und Genotyp. Diesbezüglich muss einschränkend berücksichtigt werden, dass es sich im vorliegenden Patientengut per Zufall fast ausschließlich um Fälle mit familiärem Oligodontievorkommen handelte. Bergendal et al. [6] fanden in einem bezüglich der familiären Genese unselektierten Oligodontie-Patientengut von 93 Patienten überhaupt nur in 11% der Fälle Genmutationen. Die Ergebnisse von Bergendal et al. [6] sprechen demnach nicht für eine ausgeprägte Assoziation zwischen Phänotyp und Genotyp. Doch die Autoren konzedieren selbst, dass diese fehlende Assoziation auch daran gelegen haben könnte, dass im untersuchten Patientengut zu wenig Patienten mit gleichartiger Mutation vertreten waren.

Auch wenn derzeit aufgrund der wissenschaftlichen Datenlage nicht geklärt werden kann, ob tatsächlich ein Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp bei Patienten mit Oligodontien besteht, muss sich der Kieferorthopäde seiner diesbezüglichen medizinischen Verantwortung bewusst sein. Nichtanlagen sind ein ektodermales Zeichen, das im Gegensatz zu anderen ektodermalen Abnormitäten, z. B. im Rahmen einer schwach ausgeprägten ektodermalen Dysplasie, sehr einfach und zweifelsfrei diagnostiziert werden kann. Nur etwa ein Drittel der an Zahnkliniken überwiesenen Oligodontiepatienten haben bereits eine medizinische Syndromdiagnose [61]. Dagegen zeigen etwa zwei Drittel der Oligodontie-Patienten extraorale ektodermale Symptome an Haaren, Nägeln oder Schweißdrüsen [51]. Eine erweiterte kieferorthopädische Diagnostik und vor allem eine erhöhte Aufmerksamkeit hinsichtlich der Zusammenhänge könnten wesentlich beitragen zur Identifizierung von Patienten mit Mikrosymptomen, d. h. genetischen Risikopatienten.

Da die Anzahl der in der Literatur beschriebenen Oligodontiepatienten deutlich zwischen den Genen variiert, liegt die Vermutung nahe, dass der Kieferorthopäde im klinischen Alltag auch unterschiedlich häufig mit den einzelnen Genotypen konfrontiert sein wird. Das PAX9-Gen hat die höchste Mutationsrate mit 33 bekannten Genvarianten und 93 detailliert beschriebenen Oligodontiepatienten. PAX9-Mutationen sind bisher nur als non-syndromale Erkrankungen beschrieben [23, 45, 49], d. h. nach heutigem Kenntnisstand haben PAX9-Patienten kein erhöhtes Risiko für syndromale Erkrankungen oder Fehlbildungen abgesehen von der Oligodontie. Am zweithäufigsten scheinen EDA-Mutationen zu sein, dafür sind in der Literatur zehn Genvarianten und 51 Oligodontie-Patienten beschrieben. EDA-Mutationen können neben non-syndromalen Oligodontien [5, 47, 63, 68] auch ektodermale Dysplasien (ED) verursachen [27]. Die ektodermale Dysplasie ist eine heterogene genetische Erkrankung, die in variablem Ausmaß alle Strukturen des äußeren Keimblattes, also des Ektoderms betreffen kann (Haare, Nägel, Zähne, Haut, Schweißdrüsen). Eine vollständige Ausprägung des Krankheitsbildes führt z.B. zum hypohidrotischen bzw. anhidrotischen ektodermalen Dysplasiesyndrom [17, 31, 48, 57].

multibracket treatment in nonsyndromic oligodontia patients should realize that a reduced salivary flow rate in carriers of microforms of ectodermal dysplasia might increase the risk of caries [51].

MSX1 mutations were the third most frequent mutation in our review, including 12 reported gene variants in a total of 33 oligodontia patients. In addition to potentially causing nonsyndromic oligodontia, disturbances in MSX1 gene expression may also be involved in the development of cleft lip and cleft palate [24]. Boogaard et al. [73] and De Muynck et al. [14] described patients with MSX1 mutations in whom oligodontia and cleft lip/palate were simultaneously present at the same time. MSX1 mutations are also documented in patients with simultaneous oligodontia and nail dysplasia [24]. Since it is conceivable that any descendants of nonsyndromic oligodontia patients suspected of carrying an MSX1 mutation might develop syndromic cleft lip/palate, it would be useful to offer genetic counseling to any affected couples planning to have children. MSX1 mutations have also been implicated in breast cancer [62], and although a link to tooth agenesis was not investigated in that study, others have shown that the risk of ovarian cancer was increased eightfold in hypodontia compared to nonhypodontia patients [10].

As to the nonsyndromic oligodontia cases that have been associated with EDARADD, NEMO, and KRT17, both the gene variability (1 mutation each) and the number of cases (1 patient each) is so small that we shall refrain from discussing these reports in detail [6, 19, 32]. The same applies to the mutation of the putative PAX9 promoter region, which has been reported in 7 members of the same family [42].

AXIN2 mutations turned out at an intermediate frequency in our review, including reported 6 gene variants in 17 patients. Lammi et al. [35] reported on a family with 9 pertinent oligodontia members and 1 spontaneous mutation in an unrelated oligodontia patient. Colonoscopic and sigmoidoscopic examinations of those family members available for further analysis showed that 6 out of 7 oligodontic individuals also developed colorectal neoplasia of varying severity, including cases of colorectal cancer. Marvin et al. [40] reported on another family including 4 members who showed oligodontia, very mild ectodermal manifestations (sparse hair and eyebrows), and frequent and early occurrence of colorectal and breast cancers. By contrast, Bergendal et al. [6] reported on 3 carriers of AXIN2 mutations who did not show any conditions other than oligodontia and whose parents did not have a history of malignant diseases. While there was no evidence of colorectal cancers in the grandparents, 25% of these had developed cancers at an advanced age. Thus, it appears useful to refer patients suspected of an AXIN2 mutation who also have a positive family history of malignant diseases for genetic testing early and, if required, to initiate further prophylactic examinations.

Aufgrund der verminderten Schweißsekretionsfähigkeit dieser Patienten kann es im Säuglings- und Kleinkindalter zu einer lebensbedrohlichen Hyperthermie mit daraus resultierenden zerebralen Schäden bzw. zu einem plötzlichen Kindstod kommen [33, 72]. Die Säuglingssterblichkeitsrate ist demzufolge auch heute noch deutlich erhöht [31]. Die Mortalität betroffener männlicher Kleinkinder liegt bei 28% [52]. Daher ist eine frühzeitige Diagnosestellung in der neonatalen Phase essenziell. Jedoch geben oft erst im Alter von 2 bis 3 Jahren die Nichtanlage von Zähnen und die Hypotrichose bei ED die entscheidenden Hinweise zur Diagnosefindung [77]. Aufgrund des X-chromosomal erbanges sind Männer stärker betroffen als Frauen, d. h. Frauen zeigen häufig nur milde Symptome, z. B. in Form einer non-syndromalen Oligodontie [28, 48]. Vor diesem Hintergrund ist es wichtig, vor allem Frauen mit non-syndromalen Oligodontien frühzeitig als mögliche ED-Trägerinnen zu erkennen [7], um in Folgegenerationen die Diagnosefindung zu erleichtern und geeignete Maßnahmen schon im Kleinkindalter einleiten zu können. Im Hinblick auf die meist unumgängliche Multibracketbehandlung bei Patienten mit non-syndromalen Oligodontien sollte sich der Kieferorthopäde ferner bewusst sein, dass die Speichelsekretionsrate bei ED-Mikroform-Trägern reduziert sein könnte, was ein höheres Kariesrisiko bedingt [51].

Am dritthäufigsten waren im vorliegenden systematischen Review MSX1-Mutationen. Hierfür sind in der Literatur zwölf Genvarianten und 33 Oligodontie-Patienten beschrieben. Störungen in der MSX1-Genexpression können nicht nur non-syndromale Oligodontien verursachen, sondern auch an der Entstehung von Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten beteiligt sein [24]. So beschreiben van den Boogaard et al. [73] und De Muynck et al. [14] Patienten mit MSX1-Genmutationen, bei denen die Oligodontie und LKG-Spalten gleichzeitig auftreten. Des Weiteren werden MSX1-Mutationen bei Patienten mit Nägeldysplasie bei gleichzeitiger Oligodontie beschrieben [24]. Es ist somit denkbar, dass Patienten, die bisher nur eine Oligodontie mit Verdacht einer MSX1-Mutation haben, in späteren Generationen syndromale Ausprägungen in Form einer LKG-Spalte entwickeln. Daher ist es hier sinnvoll, Paare mit Kinderwunsch und bestehender Oligodontie humangenetisch zu beraten. Ferner werden MSX1-Mutationen auch in Zusammenhang mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko gebracht [62]. Obwohl in dieser Studie kein Zusammenhang zu Nichtanlagen untersucht wurde, ist aus einer anderen Untersuchung bekannt, dass Patienten mit Hypodontie gegenüber Patienten ohne Hypodontie ein 8-fach höheres Risiko für Ovarialkarzinome aufwiesen [10].

Die Mutationsvariabilität sowie die Anzahl der betroffenen Patienten war bei EDARADD, NEMO, KRT17 (je eine beschriebene Mutation und ein Patient) und in der möglichen PAX9-Promotorregion (eine beschriebene Mutation bei sieben Patienten) [6, 19, 32, 42] so gering, dass an dieser Stelle auf eine weitere Ausführung verzichtet wird.

Darauf folgend waren AXIN2-Mutationen in der Literatur am seltensten (6 Genvarianten, 17 Patienten). Lammi et al. [35] beschreiben diesbezüglich eine Familie mit 9 oligodonten Mit-

Conclusion

Seven genes—including PAX9, EDA, MSX1, AXIN2, EDARADD, NEMO, and KRT17 in order of decreasing frequency—are currently known to have a potential for causing nonsyndromic oligodontia. One additional genetic alteration that seems to be associated with oligodontia concerns a putative PAX9 promoter region. Meta-analysis of TAC scores enabled us to link specific phenotypes of oligodontia to specific genotypes.

Conflict of interest

On behalf of all authors, the corresponding author states that there are no conflicts of interest.

References

1. Arcuri G, Zito I, Santini F et al (2011) Understanding the implications of the PAX9 gene in tooth development. *Eur J Paediatr Dent* 12(4):245–248
2. Ahmad W, Bracolini V, ul Haque M et al (1998) A locus for autosomal recessive hypodontia with associated dental anomalies maps to chromosome 16q12.1. *Am J Hum Genet* 62:987–991
3. Arte S, Nieminen P, Pirinen S et al (1996) Gene defect in hypodontia: exclusion of EGF, EGFR, and FGF-3 as candidate genes. *J Dent Res* 75:1346–1352
4. Arte S, Pirinen S (2004) Hypodontia. *Orph Encycl* 1–7. <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-hypodontia.pdf>. Accessed 29 January 2013
5. Ayub M, ur-Rehman F, Yasinai M, Ahmad W (2010) A novel missense mutation in the ectodysplasin-A (EDA) gene underlies X-linked recessive nonsyndromic hypodontia. *Int J Dermatol* 49:1399–1402
6. Bergendal B, Klar J, Stecksén-Blicks C et al (2011) Isolated oligodontia associated with mutations in EDARADD, AXIN2, MSX1, and PAX9 genes. *Am J Med Genet* 155A:1616–1622
7. Blüschke G, Nüsken KD, Schneider H (2010) Prevalence and prevention of severe complications of hypohidrotic ectodermal dysplasia in infancy. *Early Hum Dev* 86:397–399
8. Bohring A, Stamm T, Spaich C et al (2009) WNT10A mutations are a frequent cause of a broad spectrum of ectodermal dysplasias with sex-biased manifestation pattern in heterozygotes. *Am J Hum Genet* 85:97–105
9. Callahan N, Modesto A, Deeley K et al (2009) Transforming growth factor- α gene (TGFA), human tooth agenesis, and evidence of segmental uniparental isodisomy. *Eur J Oral Sci* 117:20–26
10. Chalothorn LA, Beeman CS, Ebersole JL et al (2008) Hypodontia as a risk marker for epithelial ovarian cancer: a case-controlled study. *J Am Dent Assoc* 139:163–169
11. Chishti MS, Muhammad D, Haider M, Wasim A (2006) A novel missense mutation in MSX1 underlies autosomal recessive oligodontia with associated dental anomalies in Pakistani families. *J Hum Genet* 51:872–878
12. Das P, Stockton DW, Bauer C et al (2002) Haploinsufficiency of PAX9 is associated with autosomal dominant hypodontia. *Hum Genet* 110:371–376
13. Das P, Hai M, Elcock C et al (2003) Novel missense mutations and a 288-bp exonic insertion in PAX9 in families with autosomal dominant hypodontia. *Am J Med Genet* 118A:35–42
14. De Muijnck S, Schollen E, Matthijs G et al (2004) A novel MSX1 mutation in hypodontia. *Am J Med Genet* 128A:401–403

gliedern und einen Oligodontie-Patienten mit einer Spontanmutation. Weiterführende kolonoskopische bzw. sigmoidoskopische Untersuchungen innerhalb dieser Familie zeigten, dass sechs von sieben oligodonten Familienmitgliedern, die für weiterführende Analysen zur Verfügung standen, kolorektale Neoplasien unterschiedlichen Ausprägungsgrades (bis hin zu Karzinomen) zeigten. Von Marvin et al. [40] wird eine weitere Familie mit vier Oligodontiepatienten bei sehr schwachen ektodermalen Symptomen (schütteres Haar und Augenbrauen) und gehäuftem sowie frühem Auftreten von Kolorektal- und Mammakarzinomen beschrieben. Im Gegensatz dazu waren in der Studie von Bergendal et al. [6] alle Träger von AXIN2-Mutationen (drei Patienten) abgesehen von der Oligodontie gesund. Ebenso ergab ein Interview der Eltern der Bergendal-Patienten bezogen auf Krebserkrankungen keine positiven Befunde. Auch bei den entsprechenden Großeltern gab es keine Angaben zu kolorektalen Karzinomen; wohl aber hatten 25% von ihnen Malignome im höheren Alter. Es scheint daher sinnvoll, Patienten mit Verdacht auf eine AXIN2-Mutation und positiver Familienanamnese auf Krebserkrankungen frühzeitig zu einer humangenetischen Abklärung zu überweisen und ggf. weitere Vorsorgeuntersuchungen zu veranlassen.

Schlussfolgerung

Bisher sind sieben Gene bekannt, die non-syndromale Oligodontien verursachen können, dies sind in abnehmender Häufigkeit: PAX9, EDA, MSX1, AXIN2, EDARADD, NEMO und KRT17. Eine Mutation in einer möglichen PAX9-Promoterregion scheint ebenso mit dem Auftreten von Oligodontien assoziiert zu sein. Auf der Basis des Tooth Agenesis Codes (TAC) war innerhalb des Patientengutes der Metaanalyse ein Zusammenhang zwischen Oligodontie-Phänotyp und Genotyp darstellbar.

Interessenkonflikt

Der korrespondierende Autor gibt für sich und seine Koautoren an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

15. Frazier-Bowers SA, Scott MR, Cavender A et al (2002) Mutational analysis of families affected with molar oligodontia. *Connect Tissue Res* 43:296–300
16. Frazier-Bowers SA, Guo DC, Cavender A et al (2002) A novel mutation in human PAX9 causes molar oligodontia. *J Dent Res* 81:129–133
17. Freire-Maia N (1970) A newly recognized genetic syndrome of tetramelic deficiencies, ectodermal dysplasia, deformed ears, and other abnormalities. *Am J Hum Genet* 22:370–377
18. Gábris K, Fábán G, Kaán M et al (2006) Prevalence of hypodontia and hyperdontia in paedodontic and orthodontic patients in Budapest. *Community Dent Health* 23:80–82
19. Gass JK, Wilson NJ, Smith FJ et al (2009) Steatocystoma multiplex, oligodontia and partial persistent primary dentition associated with a novel keratin 17 mutation. *Br J Dermatol* 161:1396–1398
20. Gerits A, Nieminen P, De Mynck S, Carel C (2006) Exclusion of coding region mutations in MSX1, PAX9 and AXIN2 in eight patients with severe oligodontia phenotype. *Orthod Craniofac Res* 9:129–136
21. Goldenberg M, Das P, Messersmith M et al (2000) Clinical, radiographic, and genetic evaluation of a novel form of autosomal-dominant oligodontia. *J Dent Res* 79:1469–1475
22. Han D, Gong Y, Wu H et al (2008) Novel EDA mutation resulting in X-linked non-syndromic hypodontia and the pattern of EDA-associated isolated tooth agenesis. *Eur J Med Genet* 51:536–546
23. Hansen L, Kreiborg S, Jarlov H et al (2007) A novel nonsense mutation in PAX9 is associated with marked variability in number of missing teeth. *Eur J Oral Sci* 115:330–333
24. Jumlongras D, Bei M, Stimson JM et al (2001) A nonsense mutation in MSX1 causes Witkop syndrome. *Am J Hum Genet* 69:67–74
25. Jumlongras D, Lin JY, Chapra A et al (2004) A novel missense mutation in the paired domain of PAX9 causes non-syndromic oligodontia. *Hum Genet* 114:242–249
26. Kapadia H, Frazier-Bowers S, Ogawa T, D'Souza RN (2006) Molecular characterization of a novel PAX9 missense mutation causing posterior tooth agenesis. *Eur J Hum Genet* 14:403–409
27. Kere J, Srivastava AK, Montonen O et al (1996) X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. *Nat Genet* 13:409–416
28. Khabour OF, Mesmar FS, Al-Tamimi F et al (2010) Missense mutation of the EDA gene in a Jordanian family with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia: phenotypic appearance and speech problems. *Genet Mol Res* 18 9(2):941–948
29. Kim JW, Simmer JP, Lin BP, Hu JCC (2006) Novel MSX1 frameshift causes autosomal-dominant oligodontia. *J Dent Res* 85:267–271
30. Klein ML, Nieminen P, Lammi L et al (2005) Novel mutation of the initiation codon of PAX9 causes oligodontia. *J Dent Res* 84:43–47
31. Köchlin K (1987) Molekularbiologische Genkopplungsuntersuchung zur X-chromosomal-rezessiven anhidrotischen ektodermalen Dysplasie. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, Germany
32. Ku CL, Dupuis-Girod S, Ditttrich AM et al (2005) NEMO mutations in 2 unrelated boys with severe infections and conical teeth. *Pediatrics* 115:615–619
33. Kuhlwein A, Weiss J (1982) Anhidrotic ectodermal dysplasia (Christ-Siemens-Touraine-Syndrome) in an X-linked recessive mode of inheritance. *Dermatol Monatsschr* 168:34–43
34. Lammi L, Halonen K, Pirinen S et al (2003) A missense mutation in PAX9 in a family with distinct phenotype of oligodontia. *Eur J Hum Genet* 11:866–871
35. Lammi L, Arte S, Somer M et al (2004) Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet* 74:1043–1050
36. Li WL, Cui JJ, Fang QY, Mei LX (2008) A novel mutation of MSX1 gene in a Chinese pedigree with oligodontia. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 43:157–159
37. Li S, Li J, Cheng J et al (2008) Non-syndromic tooth agenesis in two Chinese families associated with novel missense mutations in the TNF domain of EDA (ectodysplasin A). *PLoS ONE* 3(6):e2396
38. Liang J, Song G, Qing L, Bian Z (2012) Novel missense mutations in PAX9 causing oligodontia. *Arch Oral Biol* 57(6):784–789
39. Lidral AC, Reising BC (2008) The Role of MSX1 in human tooth agenesis. *J Dent Res* 81(4):274–278
40. Marvin ML, Mazzoni SM, Herron CM et al (2011) AXIN2-associated autosomal dominant ectodermal dysplasia and neoplastic syndrome. *Am J Med Genet* 155A:898–902
41. McKusick VA (1994) Mendelian inheritance in man, 11th edn. Johns Hopkins University Press, Baltimore
42. Mendoza-Fandino GA, Gee JM, Ben-Dor S et al (2011) A novel g.-1258G>A mutation in a conserved putative regulatory element of PAX9 is associated with autosomal dominant molar hypodontia. *Clin Genet* 80(3):265–272
43. Moher D, Cook DJ, Eastwood S et al (1999) Improving the quality of reporting of meta-analysis of randomized controlled trials: the QUOROM statement. *Lancet* 354:1896–1900
44. Mostowska A, Kobiela A, Biedziak B, Trzeciak WH (2003) Novel mutation in the paired box sequences of PAX9 gene in sporadic form of oligodontia. *Eur J Oral Sci* 111:272–276
45. Mostowska A, Biedziak B, Trzeciak WH (2006) A novel mutation in PAX9 causes familial form of molar oligodontia. *Eur J Hum Genet* 14:173–179
46. Mostowska A, Biedziak B, Trzeciak WH (2006) A novel c.581C>T transition localized in a highly conserved homeobox sequence of MSX1: is it responsible for oligodontia? *J Appl Genet* 47:159–164
47. Mues GL, Griggs R, Hartung AJ et al (2009) From ectodermal dysplasia to selective tooth agenesis. *Am J Med Genet* 149A:2037–2041
48. Mues G, Tardivel A, Willen L et al (2010) Functional analysis of ectodysplasin-A mutations causing selective tooth agenesis. *Eur J Hum Genet* 18:19–25
49. Nieminen P, Arte S, Tanner D et al (2001) Identification of a nonsense mutation in the PAX9 gene in molar oligodontia. *Eur J Hum Genet* 9:743–746
50. Noor A, Windpassinger C, Vitcu I et al (2009) Oligodontia is caused by mutation in LTBP3, the gene encoding latent TGF- β binding protein 3. *Am J Hum Genet* 84:519–523
51. Nordgarden H, Jensen JL, Stoehaug K (2001) Oligodontia is associated with extra-oral ectodermal symptoms and low salivary flow rates. *Oral Dis* 7:226–232
52. Nunn JH, Carter NE, Gillgrass TJ et al (2003) The interdisciplinary management of hypodontia: background and role of paediatric dentistry. *Br Dent J* 194:245–251
53. Pawlowska E, Janik-Papis K, Wisniewska-Jarosinska M et al (2009) Mutations in the human homeobox MSX1 gene in the congenital lack of permanent teeth. *Tohoku J Exp Med* 217:307–312
54. Pawlowska E, Janik-Papis K, Poplawski T et al (2010) Mutations in the PAX9 gene in sporadic oligodontia. *Orthod Craniofac Res* 13:142–152
55. Peres RCR, Scarel-Caminaga RM, Silva ER et al (2004) Absence of association between transforming growth factor- β 1 promoter polymorphisms and hypodontia. *Angle Orthod* 74:665–671
56. Rasool M, Schuster J, Aslam M et al (2008) A novel missense mutation in the EDA gene associated with X-linked recessive isolated hypodontia. *J Hum Genet* 53:894–898
57. Reed WB, Lopez DA, Landing B (1970) Clinical spectrum of anhidrotic ectodermal dysplasia. *Arch Dermatol* 102:134–143
58. Rodrigues Paixão-Côrtes V, Braga T, Salzano FM et al (2011) PAX9 and MSX1 transcription factor genes in non-syndromic dental agenesis. *Arch Oral Biol* 56(4):337–344
59. Rølling S, Poulsen S (2001) Oligodontia in Danish schoolchildren. *Acta Odontol Scand* 59:111–112
60. Schalk-van-der-Weide Y (1992) Oligodontia. A clinical, radiographic and genetic evaluation. Thesis, University of Utrecht, The Netherlands
61. Schalk-van-der-Weide Y, Beemer FA, Faber JA, Bosman F (1994) Symptomatology of patients with oligodontia. *J Oral Rehabil* 21:247–261
62. Sliwinski T, Synowiec E, Czarny P et al (2010) The c.469+46_56del mutation in the homeobox MSX1 gene – a novel risk factor in breast cancer? *Cancer Epidemiol* 5:652–655
63. Song S, Han D, Qu H et al (2009) EDA gene mutations underlie non-syndromic Oligodontia. *J Dent Res* 88(2):126–131
64. Stockton DW, Das P, Goldenberg M et al (2000) Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. *Nat Genet* 24:18–19
65. Suda N, Ogawa T, Kojima T et al (2011). Non-syndromic oligodontia with a novel mutation of PAX9. *J Dent Res* 90(3):382–386
66. Swinnen S, Baillieu-Forestier L, Arte S et al (2008) Investigating the etiology of multiple tooth agenesis in three sisters with severe oligodontia. *Orthod Craniofac Res* 11:24–31
67. Tallón-Walton V, Manzanares-Céspedes MC, Arte S et al (2007) Identification of a novel mutation in the PAX9 gene in a family affected by oligodontia and other dental anomalies. *Eur J Oral Sci* 115:427–432
68. Tao R, Jin B, Guo SZ et al (2006) A novel missense mutation of the EDA gene in a Mongolian family with congenital hypodontia. *J Hum Genet* 51:498–502
69. Tarpey P, Pemberton TJ, Stockton DW et al (2007) A novel Gln358Glu mutation in ectodysplasin A associated with X-linked dominant incisor hypodontia. *Am J Med Genet* 143A:390–394

Ruf S et al. Non-syndromale Oligodontie

70. Thesleff I (2003) Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci* 116:1647–1648
71. Thesleff I, Nieminen P (2006) Tooth morphogenesis and cell differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 8:844–850
72. Uthoff D (1989) Christ-Siemens-Touraine-Syndrom-Odontologie: Kinderheilkunde-HNO-Dysraphie. *Zahnärztl Praxis* 1:13–15
73. Boogaard MJ van den, Dorland M, Beemer FA, Amstel HK van (2000) MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet* 24:342–343
74. Wijk AJ van, Tan SP (2006) A numeric code for identifying patterns of human tooth agenesis: a new approach. *Eur J Oral Sci* 114(2):97–101
75. Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW et al (1996) A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nat Genet* 13:417–421
76. Vieira AR, Meira R, Modesto A, Murray JC (2004) MSX1, PAX9, and TGFA contribute to tooth agenesis in humans. *J Dent Res* 83:723–727
77. Walter, Agnes (2003) Diagnostische und therapeutische Ansätze der Hypo-, bzw. Anodontie bei anhidrotischer ektodermaler Dysplasie (Christ-Siemens-Touraine-Syndrom) im deutschen Sprachraum unter besonderer Berücksichtigung der implantologischen Rehabilitation. Inaugural-Dissertation, Universität Graz, Austria
78. Wang Y, Wu H, Wu J et al (2009) Identification and functional analysis of two novel PAX9 mutations. *Cells Tissues Organs* 189:80–87
79. Wang J, Jian F, Wang S et al (2009) Analysis of clinical features and mutation associated with oligodontia. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 27:606–609, 613
80. Wang J, Jian F, Chen J et al (2011) Sequence analysis of PAX9, MSX1 and AXIN2 genes in a Chinese oligodontia family. *Arch Oral Biol* 56(10):1027–1034
81. Xuan K, Jin F, Liu YL et al (2008) Identification of a novel missense mutation of MSX1 gene in Chinese family with autosomal-dominant oligodontia. *Arch Oral Biol* 53:773–779
82. Zhao JL, Chen YX, Bao L et al (2005) Novel mutations of PAX9 gene in Chinese patients with oligodontia. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 40:266–270
83. Zhao JL, Chen YX, Bao L et al (2005) Functional analysis of novel mutations in PAX9 associated with familial oligodontia. *Chin J Med Genet* 22:419–422
84. Zhao J, Hu Q, Chen Y et al (2007) A novel missense mutation in the paired domain of human PAX9 causes oligodontia. *Am J Med Genet* 143A:2592–2597
85. Zhu J, Xiang Y, Zhang C et al (2011) A novel nonsense mutation in PAX9 is associated with sporadic hypodontia. *Mutagenesis* 27(3):313–317

Correspondence address

Prof. Dr. Sabine Ruf
 Poliklinik für Kieferorthopädie
 Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
 Schlangenzahl 14
 35392 Gießen, Germany
 sabine.ruf@dentist.med.uni-giessen.de

5.1.2 Case Report: Novel mutation in the EDA gene associated with oligodontia

Ruiz-Heiland G, Jabir S, Wende W, Bock N, Ruf S. Novel mutation in the EDA gene associated with oligodontia. *J Orofac Orthop.*, submitted 2014.

Abstract:

Mutations in the EDA-EDAR-EDARADD genes and more recently mutations in the WNT10a gene have been described as the cause of syndromic and non-syndromic tooth agenesis concomitant with diverse abnormalities of ectodermally derived tissues. In the present work, two brothers presenting severe tooth agenesis (oligodontia) as well as six family relatives were analyzed. Genomic DNA was isolated from saliva and genetic screening was performed by means of direct sequencing of PCR fragments covering the entire coding regions and the intron-exon junctions of the EDA, EDAR, EDARADD as well as the WNT10a genes. Mutation analysis was performed using the Mutations Surveyor Software. We identified a novel maternally inherited G>A mutation located on exon 7 at nucleotide position c.866 in the EDA gene. The nucleotide change results in a substitution of arginine by histidine (p.R289H). In addition, the genetic analysis showed synonymous SNPs variants in EDAR and EDARADD whereas no variants or mutations in the WNT10a gene were detected. Based on a computerized protein structure analysis, we suggest that this novel mutation impairs the protein-protein interactions of EDA resulting in oligodontia concomitant with a mild ED phenotype.

Keywords: Ectodysplasin-A (EDA), Mutations, Oligodontia.

Corresponding author: Gisela Ruiz-Heiland. Department of Orthodontics, Justus-Liebig University of Giessen, Schlangenzahl 14, Giessen, D-35392, Germany. Tel:+49 641 99 46121/46131; fax: +49 641 99 46119. E-mail: gisela.ruiz-heiland@dentist.med.uni-giessen.de.

Introduction:

Tooth agenesis is a common developmental abnormality. It's most severe form, known as oligodontia, is defined as the absence of more than six permanent teeth excluding third molars and has been reported to affect around 0.08 to 0.16% of the caucasian population (Rolling and Poulsen, 2001; Ruf et al., 2013). Oligodontia can occur as a non-syndromic abnormality or concomitant with other forms of congenital pathologies in which ectodermally derived organs are frequently affected.

Mutations in the EDA gene have been described in X-linked ectodermal dysplasia whereas mutations in the WNT10A gene are responsible for onycho-odontodermal-dysplasia and Schöpf-Schulz-Passarge syndrome. In addition, mutations in the EDA-EDAR-EDARADD genes as well as mutations in the WNT10a gene have been shown in around 90 % of hypohidrotic/anhidrotic ectodermal dysplasia cases (Cluzeau et al., 2011). The phenotypic expression of WNT10A mutations and to a larger extent those of EDA-EDAR-EDARADD mutations can vary in severity between patients. Recently, different studies have linked single or digenic mutations in these genes to non-syndromic isolated cases of tooth agenesis (He et al., 2013; Ruf et al., 2013; Tao et al., 2006).

The EDA gene, located at the long arm of the X chromosome (Xq12-13.1) codes for Ectodysplasin-A, a soluble protein member of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily composed by a transmembrane domain, a furin cleavage site, a collagen type area and a C-terminal TNF-like structure. After proteolysis at the furin consensus site, the C-terminal portion containing the collagen domain and the TNF homology domain is released as soluble trimer (Sadier et al., 2014). The isoform EDA1 interact with the receptor EDAR whereas the isoform EDA2 interacts with XEDAR. Activation of EDAR by interaction of its death domain with an adaptor protein (EDARADD) results in NF-KB translocation into the nucleus where it induces the transcription of many essential genes for the initiation and differentiation of ectodermally derived tissues as skin, hair, teeth and sweat glands (Courtney et al., 2005; Mikkola et al., 1999). Activation of XEDAR commits NF-KB activation without EDARADD involvement. However, only EDA/EDAR interactions seem to be relevant for ectodermal appendages development (Botchkarev and Fessing, 2005; Mues et al., 2010; Newton et al., 2004). In the present study, two patients presented oligodontia and different signs of ectodermal abnormalities in conjunction with a family history of hypo and/or oligodontia were genetically analyzed.

Methods:

Two brothers affected from oligodontia and six consanguineous relatives were included in the study. The patients belong to a mixed ethnical group, maternally caucasian and paternally afro-american. For the description of the missing teeth the international TAC agenesis code was used (van Wijk and Tan, 2006). Signed consent prior to genetic analysis was obtained from all individuals. Approval of this study was granted by the Ethic Committee of the University of Giessen (File number: 122/12).

Saliva was collected under medical supervision using OG-500 Saliva self-collection 2 ml kits (DNAGenotek, Canada) and DNA was isolated according to manufacturer instructions. Based on the human RefSeq database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/proteins>) the coding region of the EDA, EDAR, EDARADD and WNT10A genes as well as their intron-exon boundaries were identified and a PCR strategy was developed. The newly established PCR protocol was validated on a human DNA reference sample before amplifying the respective patient samples. Standard PCR conditions were used. Primer sequences are presented as supplementary tables 1, 2, 3 and 4.

PCR purification and bi-directional Sanger sequencing of the EDA, EDAR and EDARADD genes was performed at Microsynth (Balgach, Switzerland) and that of the WNT10A gene was performed at the research laboratory of the Department of Orthodontics at the Justus-Liebig University in Giessen.

All coding regions and intron-exon boundaries were analyzed for mutations (SNPs and Indels) using the software Mutation Surveyor v3.2 (SoftGenetics, USA). In addition, mutations were checked visually using the software ChromasLite 2.1 (Technelysium Pty Ltd.).

SNPs were validated using the gene database www.ensembl.org. The SNP prevalence within the general population was described using and the Global MAF (Minor Allele Frequency) code.

The model of the Ectodysplasin-A protein, with the position of the novel mutants indicated, is based on the 1RJ7 structure in the RCSB protein data bank and was generated using the PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.6 Software (Schrödinger, LLC).

Results:

Oligodontia concomitant with signs of skin abnormalities (hypopigmented skin) and sparse wiry hair (hypotrichosis) were observed in both individuals. The younger patient shows an abnormal ear shape (pointed ears).

The oral examination of patient III:1 revealed the absence of six permanent teeth with the TAC quadrant values 2,2,3,3 (Figure 1) while his younger brother (III:2) had an agenesis of twelve permanent teeth. His TAC quadrant values are 14,14,19,19 (Figure 2).

Gene sequencing revealed an EDA missense mutation involving a G>A transition at c.866 (Figure 3 A). This substitution results in a change from Arginine (CGC) to Histidine (CAC) at the amino acid position p.289 corresponding to the TNF homology subdomain.

The topology diagram of the EDA monomer indicates that this amino acid position is located on a beta hairpin and sticks out of protein core. (Figure 3 B-C). The surface representation of the EDA trimer shows that the location of the p.H289 presumably could interfere with protein-protein contacts (Figure 3 D).

The EDA receptor (EDAR) mutation analysis revealed a synonymous variant (silent mutations) at c.846 C>T (p.S282) in both individuals. This variant occurs in 7% of the population (MAF:0.07).

The patient III:1 had a second synonymous variant S=S (p.S306) at c.918 C=C/C>A (MAF: 0.02) whereas the patient III:2 presented another synonymous variant in the cysteine amino acid at c1152 C=C/C>T (p.C384) (MAF value: 0.23). Both patients presented also a synonymous variant on the EDARADD gene at the position c.339 C=C/C>T, resulting in a silent mutation at the amino acid Alanine (p.D113). This variation has a MAF value of 0.15. No mutations were found within the four exons or the exon-intron boundaries of the WNT10A gene.

The family pedigree indicated that the mother of both patients (II:2) presented no dental abnormalities or agenesis whereas her deceased father (I:1) had suffered from oligodontia. The mother has two more children with a second partner (II:3), a son (III:3) presenting normal dentition and a daughter (III:4) in which a milder form of tooth agenesis (hypodontia) is observed. The mother has also one sister (II:4) without tooth agenesis, who's two daughters (III:5-6) present a normal dentition (Figure 4).

Mutation analysis for EDA showed heterozygosity at the position c.866 G=G/G>A in probands II:2; II:4; III:4 and III:5, whereas no mutations were detected in the probands II:3 and III:3, indicating a maternal inheritance pattern of the novel EDA mutation.

Discussion:

A novel maternally inherited X-linked G>A mutation in the EDA gene located at nucleotide position c.866 resulting in the substitution of arginin by histidin (p.Arg289His) in a family affected by oligodontia was discovered.

According to the protein model of Ectodysplasin-A, it is presumed that variations at the position p.289 abolish the stabilization of EDA, resulting in the impairment or disturbance of protein-protein interactions whereas internal EDA-trimer bindings remain unaffected. Based on these observations, the mutation c.866 G>A on the EDA gene could be consider pathogenic.

Other mutations at this position have also been described in asiatic oligodontia cases: Song et al. (Song et al., 2009) reported the mutation c.865C>T (p.R289C) in a severe case of non-syndromic tooth agenesis lacking any other signs of ectodermal abnormalities. Recently, Lee et al. (Lee et al., 2014) reported a novel c.866G>T (p.R289L) in a family suffering from oligodontia that presented abnormal curly hair in affected males. However, the present substitution of the p.289 Arginine to the amino acid Histidine seems to have a more pronounced effect on phenotypic signs of ectodermal abnormalities despite tooth agenesis, since the two affected patients showed areas of hypopigmented skin, hypotrichosis and abnormal ear shape.

Tooth formation is a complex process that shares many similarities with other ectodermal organs such as hair, including the initiation from an epithelial placode and reciprocal interactions of the epithelial and mesenchymal components (van Wijk and Tan, 2006). The growing epithelium forms a bud around which the dental mesenchyme condenses. During dental morphogenesis, the epithelial tissue folds to a cap and then to a bell shape, in which enamel knots regulate the growth and shape of the tooth. Later on, cell differentiation occurs when enamel-secreting odontoblasts and dentin secreting dentinoblasts mature from the epithelial and mesenchymal cell compartments respectively (Jussila and Thesleff, 2012). This process is governed by a complex series of genetic interactions that orchestrate sequential and reciprocal signaling actions (Nieminen, 2007). It has been proposed that fibroblast growth factors (FGFs) as well as wingless (WNTs) and ectodysplasin-A (EDA) promote the primary placode formation (Mustonen et al., 2004; Nieminen, 2007). WNTs initiated activation of the Beta-Catenin pathway is required for the formation of primary teeth structures since it has been

shown that the expressions of FGF4 in the enamel knots as well as EDA in the early epithelium are WNT dependent (Kratochwil et al., 2002; Laurikkala et al., 2001; Mikkola et al., 1999). EDA upregulation will subsequently promote sonic hedgehog (SHH) expression and bone morphogenetic proteins (BMPs) activity inhibition, processes that allow for a proper tooth morphogenesis (Pummila et al., 2007).

Among the different WNTs that are expressed during tooth formation, WNT10A plays a key role in odontoblast differentiation as well as in tooth morphogenesis (He et al., 2013; Yamashiro et al., 2007). In vitro studies have shown that WNT10A down-regulation impairs odontogenesis and mesenchymal cell proliferation (Liu et al., 2013). Its relevance has also been demonstrated in several recent studies which show that mutations in the WNT10A gene are present in more than 50% of the cases of isolated tooth agenesis (van den Boogaard et al., 2012).

Likewise, the EDA-EDAR signaling pathway plays a central role during organogenesis. The expression of the EDA receptor (EDAR) is detected in early stages of tooth development until cusp formation (Pispa et al., 2004). EDA as well as EDAR are coexpressed in the primary ectoderm (Tucker et al., 2000). After placode formation, EDAR remains expressed in the placode itself whereas EDA shows a complementary expression. In later stages, EDAR is detected in ectodermal signaling centers such as in primary and secondary enamel knots (Laurikkala et al., 2001).

According to a recent systemic literature review published by our group, the known mutations in the EDA gene that are associated with selective tooth agenesis are located on exons 1, 3, 6, 7 and 8. The majority of these mutations affects the coding area for the TNF homology subdomain (Ruf et al., 2013). However, to date, no correlations between the type and location of the gene mutation and the severity of the corresponding phenotypes (number and position of missing teeth) could be established (Mues et al., 2010; van Wijk and Tan, 2006)

Sequencing analysis of EDAR as well as EDARADD showed diverse synonymous variants in our patients, however no adaptive mutations that could compensate for the structural changes caused by the novel EDA c.866 G>A mutation (p.R289H) could be detected. Further, functional analysis and characterization of the here-described novel mutation is necessary to elucidate its relevance in detail.

Acknowledgments:

We thank the German Orthodontic Society (www.dgkfo.de) for funding the research project; the patients and their family members for their participation in the study; D.

Nolte (Institute for Human Genetics of the Justus-Liebig University) and C. Grüning (Microsynth, Balgach Switzerland) for their support.

References:

Botchkarev VA, Fessing MY (2005). Edar signaling in the control of hair follicle development. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research* 10(3):247-251.

Cluzeau C, Hadj-Rabia S, Jambou M, Mansour S, Guigue P, Masmoudi S *et al.* (2011). Only four genes (EDA1, EDAR, EDARADD, and WNT10A) account for 90% of hypohidrotic/anhidrotic ectodermal dysplasia cases. *Human mutation* 32(1):70-72.

Courtney JM, Blackburn J, Sharpe PT (2005). The Ectodysplasin and NFkappaB signalling pathways in odontogenesis. *Archives of oral biology* 50(2):159-163.

He H, Han D, Feng H, Qu H, Song S, Bai B *et al.* (2013). Involvement of and interaction between WNT10A and EDA mutations in tooth agenesis cases in the Chinese population. *PloS one* 8(11):e80393.

Jussila M, Thesleff I (2012). Signaling networks regulating tooth organogenesis and regeneration, and the specification of dental mesenchymal and epithelial cell lineages. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(4):a008425.

Kratochwil K, Galceran J, Tontsch S, Roth W, Grosschedl R (2002). FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in Lef1(-/-) mice. *Genes & development* 16(24):3173-3185.

Laurikkala J, Mikkola M, Mustonen T, Aberg T, Koppinen P, Pispä J *et al.* (2001). TNF signaling via the ligand-receptor pair ectodysplasin and edar controls the function of epithelial signaling centers and is regulated by Wnt and activin during tooth organogenesis. *Developmental biology* 229(2):443-455.

Lee KE, Ko J, Shin TJ, Hyun HK, Lee SH, Kim JW (2014). Oligodontia and Curly Hair Occur with Ectodysplasin-A Mutations. *Journal of dental research*.

Liu Y, Han D, Wang L, Feng H (2013). Down-regulation of Wnt10a affects odontogenesis and proliferation in mesenchymal cells. *Biochemical and biophysical research communications* 434(4):717-721.

Mikkola ML, Pispä J, Pekkanen M, Paulin L, Nieminen P, Kere J *et al.* (1999). Ectodysplasin, a protein required for epithelial morphogenesis, is a novel TNF homologue and promotes cell-matrix adhesion. *Mechanisms of development* 88(2):133-146.

Mues G, Tardivel A, Willen L, Kapadia H, Seaman R, Frazier-Bowers S *et al.* (2010). Functional analysis of Ectodysplasin-A mutations causing selective tooth agenesis. *European journal of human genetics : EJHG* 18(1):19-25.

Mustonen T, Ilmonen M, Pummila M, Kangas AT, Laurikkala J, Jaatinen R *et al.* (2004). Ectodysplasin A1 promotes placodal cell fate during early morphogenesis of ectodermal appendages. *Development* 131(20):4907-4919.

Newton K, French DM, Yan M, Frantz GD, Dixit VM (2004). Myodegeneration in EDA-A2 transgenic mice is prevented by XEDAR deficiency. *Molecular and cellular biology* 24(4):1608-1613.

Nieminen P (2007). Molecular Genetics of Tooth Agenesis

(Academic Dissertation). Helsinki, University of Helsinki.

Pispä J, Mustonen T, Mikkola ML, Kangas AT, Koppinen P, Lukinmaa PL *et al.* (2004). Tooth patterning and enamel formation can be manipulated by misexpression of TNF receptor Edar. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 231(2):432-440.

Pummila M, Fliniaux I, Jaatinen R, James MJ, Laurikkala J, Schneider P *et al.* (2007). Ectodysplasin has a dual role in ectodermal organogenesis: inhibition of Bmp activity and induction of Shh expression. *Development* 134(1):117-125.

Rolling S, Poulsen S (2001). Oligodontia in Danish schoolchildren. *Acta odontologica Scandinavica* 59(2):111-112.

Ruf S, Klimas D, Honemann M, Jabir S (2013). Genetic background of nonsyndromic oligodontia: a systematic review and meta-analysis. *J Orofac Orthop* 74(4):295-308.

Sadier A, Viriot L, Pantalacci S, Laudet V (2014). The ectodysplasin pathway: from diseases to adaptations. *Trends in genetics : TIG* 30(1):24-31.

Song S, Han D, Qu H, Gong Y, Wu H, Zhang X *et al.* (2009). EDA gene mutations underlie non-syndromic oligodontia. *Journal of dental research* 88(2):126-131.

Tao R, Jin B, Guo SZ, Qing W, Feng GY, Brooks DG *et al.* (2006). A novel missense mutation of the EDA gene in a Mongolian family with congenital hypodontia. *Journal of human genetics* 51(5):498-502.

Tucker AS, Headon DJ, Schneider P, Ferguson BM, Overbeek P, Tschopp J *et al.* (2000). Edar/Eda interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis. *Development* 127(21):4691-4700.

van den Boogaard MJ, Creton M, Bronkhorst Y, van der Hout A, Hennekam E, Lindhout D *et al.* (2012). Mutations in WNT10A are present in more than half of isolated hypodontia cases. *Journal of medical genetics* 49(5):327-331.

van Wijk AJ, Tan SP (2006). A numeric code for identifying patterns of human tooth agenesis: a new approach. *Eur J Oral Sci* 114(2):97-101.

Yamashiro T, Zheng L, Shitaku Y, Saito M, Tsubakimoto T, Takada K *et al.* (2007). Wnt10a regulates dentin sialophosphoprotein mRNA expression and possibly links odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. *Differentiation; research in biological diversity* 75(5):452-462.

Figure legends:

Figure 1: A) Patient (III:1) presents areas of skin hypopigmentation and wiry sparse hair (hypotricosis). B) The radiological examination of the dental structures revealed the absence of both upper lateral and all lower incisors.

Figure 2: A) Patient (III:2) presents abnormal ear shape and wiry sparse hair (hypotricosis). B) Panoramic radiography showing the absence of the upper lateral incisors, canines and first premolars. In the lower jaw, the four incisors, the right first premolar and the left second premolar are absent. The four deciduous molars are persisting.

Figure 3: A) Sequencing graphic showing the substitution G>A at the coding position c. 866 of EDA. B-C) Ribbon representation and topology diagram of EDA monomer (pdb: 1RJ7). The mutations found in the patients determine the new agenesis-causing EDA variant p.R289H. The position of p.289 is located on a beta hairpin and the amino acid side chain sticks out of protein core. D) Model of EDA trimer in a surface representation (pdb: 1RJ7). The position of p.289 is marked in pink.

Figure 4: Schema representing the family pedigree. Individuals suffering from hypo or oligodontia are marked in blue. The patients presenting oligodontia (III:1 and III:2) are labeled with the letter O. The letter H signs the subject (III:4) presenting hypodontia.

Supplementary table 1: Primers employed for the amplification and sequencing of the EDA gene.

Supplementary table 2: Primers employed for the amplification and sequencing of the WNT10a gene.

Supplementary table 3: Primers employed for the amplification and sequencing of the EDAR gene.

Supplementary table 4: Primers employed for the amplification and sequencing of the EDARADD gene.

Figure 1

A)



B)



7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	
7	6	5	4	3	2	1	1	2	1	3	4	5	6	7

Figure 2

A)



B)



7	6	5	X	X	X	1	1	X	X	X	5	6	7
7	6	5	X	3	X	X	X	X	3	4	X	6	7

Figure 3

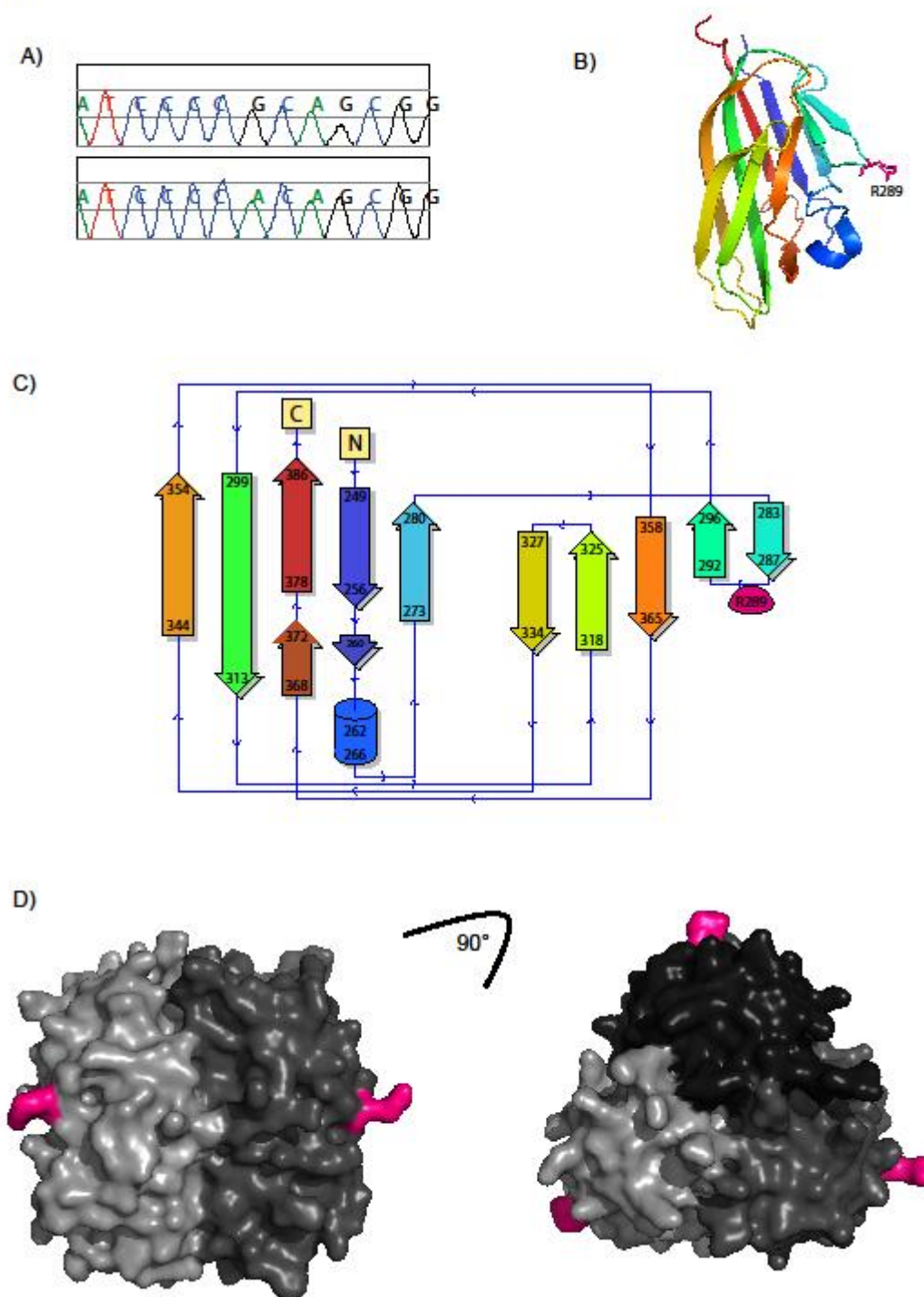
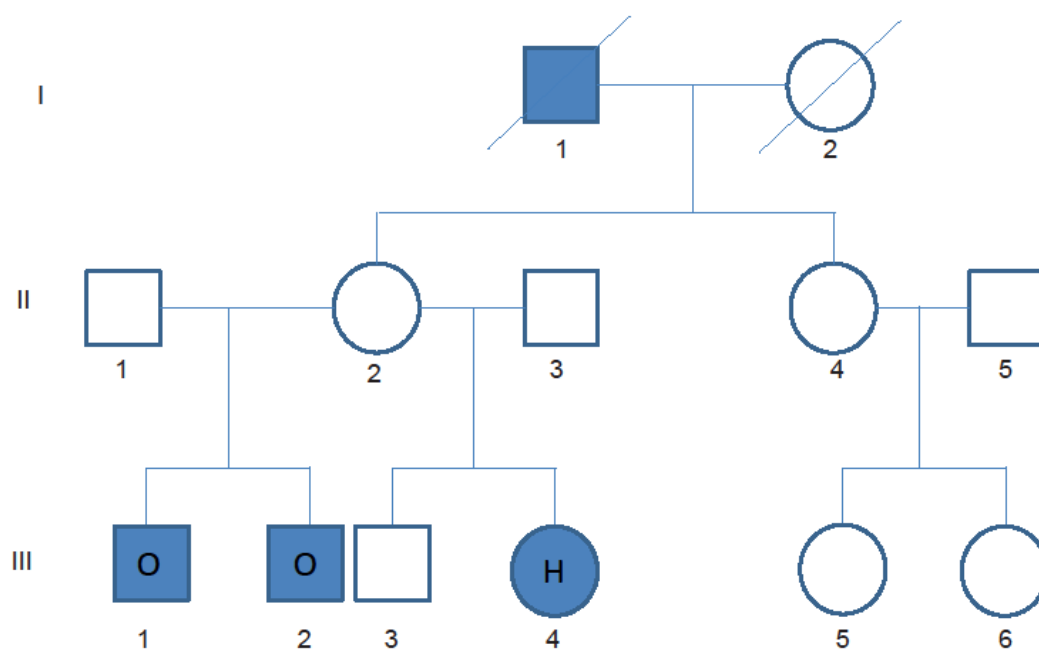


Figure 4



Supplementary table 1

	Exon 1
Fw	5'CTTTGCTCTACTTTCTTTCC3'
Rv	5'GTCCTGCCCTCTAAATTG3'
	Exon 2
Fw	5'CTACATGATTGGAATAATAATGGTATC3'
Rv	5'AGTAGAGACAGGGTTTCAC3'
	Exon 3
Fw	5'CAGGAGTCAGAAGACAGAATG3'
Rv	5'AACTACAATACTCAAGAAGATAACAT3'
	Exon 4
Fw	5'GTAATCCCAGTTACTCCAGAG3'
Rv	5'CTTGTCCAATTCCTAGTTTAC3'
	Exon 5
Fw	5'TGGAGAATAAAGCTCAGACAG3'
Rv	5'CTATTCATAGAGATGGGAGGG3'
	Exon 6
Fw	5'ATATTACCCTCTAGTAGAAATGTAG3'
Rv	5'GAGCAAAGAATGACTTCGTATG3'
	Exon 7
Fw	5'TGCTTTCAAATGCTCTTCTTA3'
Rv	5'TCTCTCTTTCCTCTTTCAAC3'
	Exon 8
Fw	5'AAGATTCTGTCAATTCACCAC3'
Rv	5'AATTCAGACCATCTTCCTTC3'

Supplementary table 2

	Exon 1
Fw	5'GAGTCGGAGCTGTGTGTCGCA3'
Rv	5'CCCAGCAAGAGCATCAGAGGC3'
	Exon 2
Fw	5'GACAGAGTGTGTGTTGTAGATG3'
Rv	5'GCCAACAGATGGGTGTGTGTG3'
	Exon 3
Fw	5'AGTTTCTCCTTGGAATGATGA3'
Rv	5'AGAAGATTGCCAAGGTGTGACAT3'
	Exon 4
Fw	5'CCTCAGCGTTTGCCTCTGTATAATGG3'
Rv	5'GTGGTCCAATCTCCTCTTCCCAAG 3'

Supplementary table 3

	Exons 1-2
Fw	5'CTGTTTGCTGGAAGGC3'
Rv	5'GCTCTTGCCATCAATCTC3'
	Exon 3
Fw	5'TTGTAGCAAGCTGAGGAAAG3'
Rv	5'CCACTTAGGAGACACAGAG3'
	Exon 4
Fw	5'AAAGAATGCTCCATTCAAGAC3'
Rv	5'GACTCAAGGCTCAGATGTG3'
	Exon 5
Fw	5'ACAATAACGATGACTCTTAGG3'
Rv	5'CCAGTGATAGAATTGCTGTTAAC3'
	Exons 6-8
Fw	5'TTCTCAGTCTAAGCAAGC3'
Rv	5'TCGGATGTTAAGGAGGAAG3'
	Exon 9
Fw	5'GTGTATGTCTCGTCTCATG3'
Rv	5'ATCTTGCTGTGAACTTGTC3'
	Exon 10
Fw	5'CAAGTATCTTACGAGTCTGAC3'
Rv	5'GAGATGCCTCCGATATC3'
	Exon 11
Fw	5'TCATTGTCAATATAGCAGTC3'
Rv	5'AGTCCTCAACATTGTCTC3'

Supplementary table 4

	Exon 1
Fw	5'AGGCAGACCAAGAGGAAG3'
Rv	5'CTCAGCTCTGAGAAATCCAG3'
	Exon 2
Fw	5'GGAGTAAGGTTTCTTCAGC3'
Rv	5'CTTTGGGGTTTCTGATGC3'
	Exon 3
Fw	5'AGCATTAACCTCTTGTC AAC3'
Rv	5'CACAAGTCACGAGCTAATC3'
	Exon 4
Fw	5'CACCACGGAGTGTGTGCTT3'
Rv	5'CCCTGTTTATGATCTAGAAATCCTG3'
	Exon 5
Fw	5'GTGTCTGCTGTGTATCAAG3'
Rv	5'GTTCAAGCGATTCTCCTG3'
	Exon 6
Fw	5'CGAGCATTCTGAAATAGTC3'
Rv	5'CAGTGTCCACTGTTCCA3'

5.2 zitierfähige Abstracts

- 5.2.1** Jabir S, Bock N, Ruiz-Heiland G, Ruf S. Non-syndromic oligodontia—a risk marker for cancer? *Eur J Orthod* (2013) 35 (5): e3-e207.

030 NON-SYNDROMIC OLIGODONTIA – A RISK MARKER FOR CANCER?

S Jabir, N C Bock, G Ruiz-Heiland, S Ruf, Department of Orthodontics, University of Giessen, Germany

e18

AIM: To systematically search the literature for the location of known mutations associated with non-syndromic oligodontia (NSO = at least six congenitally missing permanent teeth excluding third molars) and to compare them with the location of cancer associated mutations on the same genes.

MATERIALS AND METHOD: A systematic electronic search of two databases (PubMed, Medpilot) was carried out with supplemental hand searching until 03-2012 (search terms were: oligodontia and genes, oligodontia and mutations, tooth agenesis and genes, tooth agenesis and mutations). The search was limited to the AXIN2-, MSX1-, PAX9- and EDA-genes. Furthermore, PubMed was searched for cancer associated mutations (search terms: AXIN2/MSX1/PAX9/EDA and mutation and cancer).

RESULTS: Cancer/NSO associations were found for AXIN2 and MSX1. One hundred per cent of all known NSO causing AXIN2 mutations and 66 per cent of all cancer causing AXIN2 mutations (different cancer types) are located on exons 8 and 9. In addition, cancer mutations are known for the MSX1 intron, while the main location for NSO causing MSX1 mutations is on exon 2 (50%). No cancer/NSO association was found for PAX9 and EDA. While for PAX9 a marked clustering of the NSO mutations was seen (84% on exon 2), this effect was reduced for EDA (50% on exon 8).

CONCLUSION: For PAX9 and EDA, no cancer/NSO association was found, but the NSO causing mutations showed a marked to moderate clustering. However, a strong association seems to exist between the locations of NSO and cancer causing mutations on AXIN2. A minor cancer/NSO association was found for MSX1. Therefore, AXIN2 and MSX1 non-syndromic oligodontia phenotypes might be a risk marker for cancer.

Downloaded from <http://ejk>

- 5.2.2** Ruiz-Heiland, Jabir S, Bock N, Nolte D, Ruf S. Identification of a novel mutation in the EDA gene associated with non-syndromic oligodontia. *Eur J Orthod* (2014) 36 (5): e1-e244.

394 IDENTIFICATION OF A NOVEL MUTATION IN THE EDA GENE ASSOCIATED WITH NON-SYNDROMIC OLIGODONTIA

G Ruiz Heiland¹, S Jabir¹, N Bock¹, D Nolte², S Ruf¹, Departments of ¹Orthodontics and ²Human Genetics, Justus-Liebig University, Gießen, Germany

AIM: Mutations in the EDA gene are commonly associated with X-linked hypohydrotic ectodermal dysplasia. Recently, mutations in this gene have been associated with non-syndromic tooth agenesis. In the present study a novel EDA mutation in two brothers presenting oligodontia is described.

SUBJECTS AND METHOD: Two brothers suffering from oligodontia without clear syndromic features as well as their available relatives were analyzed. A total of eight family members (Patients A-H) were evaluated.

e198

Genomic DNA of all subjects was isolated from saliva. Genetic screening was performed by means of direct sequencing of polymerase chain reaction (PCR) fragments covering the entire coding regions and the intron exon junctions of the EDA gene, as well as the WNT10a gene. Mutation analysis was performed using the Mutations Surveyor Software.

RESULTS: A novel G to A mutation located in exon 7 at nucleotide position 866 (c.866G>A) was identified in the EDA gene. The nucleotide change resulted in the substitution of an arginine by a histidine (P.R289H). This mutation was inherited maternally. The two brothers (Patients A and B) presented few signs of skin abnormalities and wiry hair. Patient A had six missing teeth with a tooth agenesis code (TAC) sum of 10 (TAC quadrant values 2, 2, 3, 3) while his younger brother (Patient B) had agenesis of 23 permanent teeth. The TAC sum of this subject was 66 (TAC quadrant values 14, 14, 19, 19). The pedigree evaluation indicated that the mother (Patient C) of both individuals presented no dental abnormalities or agenesis whereas her deceased father had suffered from oligodontia. The mother has two more children with a second partner: a son presenting a normal dentition (Patient D) and a daughter with hypodontia (Patient E). The mother has one sister (Patient F) who did not show any tooth agenesis like her two daughters (Patients G and H).

CONCLUSION: The EDA signalling pathway plays a key role during tooth formation. Here, a novel EDA gene mutation concomitant with Oligodontia is shown.

5.3 Vorträge (V) und Poster (P)

5.3.3 P1

Moyers Symposium 07.-08.03.2013, Ann Arbor



Non-syndromic oligodontia (NSO) – a risk marker for cancer?

N. Bock, S. Jabir, G. Ruiz-Heiland and S. Ruf; Department of Orthodontics, University of Giessen, Germany.

Conclusions

For PAX9 and EDA, no cancer/NSO association was found, but the NSO causing mutations showed a marked to moderate clustering. However, a strong association seems to exist between the locations of NSO and cancer causing mutations on AXIN2. A minor cancer/NSO association was found for MSX1. Therefore, AXIN2 and MSX1 non-syndromic oligodontia phenotypes might be a risk marker for cancer.

Introduction

So far, four genes have been shown to be frequently associated with non-syndromic oligodontia (NSO - at least 6 congenitally missing permanent teeth excluding third molars): AXIN-2 (Axis inhibition protein 2), MSX1 (Muscle segment homeobox 1), PAX9 (Paired-box gene 9), EDA (Ectodysplasin-A).

As dysplasias are often indicative of early neoplastic processes, NSO-patients might exhibit or be predisposed to additional disease. For example, Lammi et al. (2004) showed an association of AXIN2-mutations and colorectal cancer and Marvin et al. (2010) described a family with AXIN2-mutations, where both, colorectal and breast cancer accumulated.

Furthermore, disturbances in MSX1-expression are associated with cleft lip and palate and patients with EDA-mutations often show other affected ectodermal structures (hair, skin, nails) up to hydrotic ectodermal dysplasia.

Objective

To systematically search the literature for the location of known mutations associated with NSO and to compare them with the location of cancer associated mutations on the same genes.

Method

A systematic electronic search of two databases (PubMed, Medpilot) was carried out with supplemental hand searching until 03-2012 (search terms were: *oligodontia and genes, oligodontia and mutations, tooth agenesis and genes, tooth agenesis and mutations*). The search was limited to the AXIN2-, MSX1-, PAX9- and EDA-genes.

Furthermore, PubMed was searched for cancer associated mutations (search terms: *AXIN2/MSX1/PAX9/EDA and mutation and cancer*).

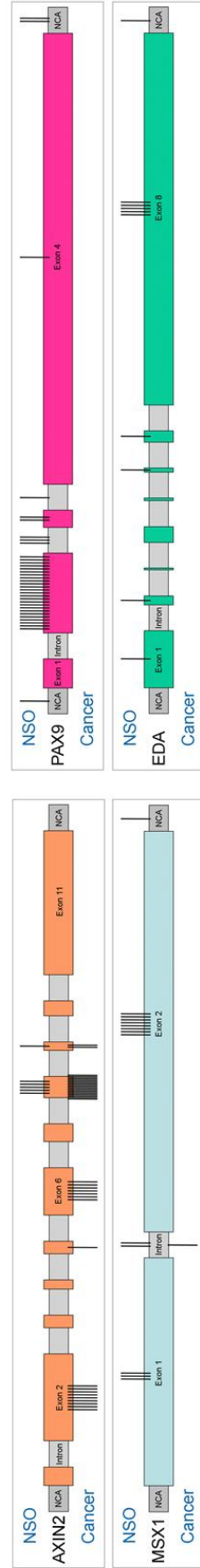
Results

Cancer/NSO associations were found for AXIN2 and MSX1. 100% of all known NSO causing AXIN2 mutations and 54% of all cancer causing AXIN2 mutations (different cancer types) are located on exons 8 and 9. In addition, cancer mutations are known for the MSX1 intron, while the main location for NSO causing MSX1 mutations is on exon 2 (57%).

No cancer/NSO association was found for PAX9 and EDA. While for PAX9 a marked clustering of the NSO mutations was seen (71% on exon 2), this effect was reduced for EDA (50% on exon 8).

Figure

Locations of known NSO and cancer causing mutations on exons (colored areas), introns (grey-shaded) and non-coding areas (=NCA, grey) for AXIN2, MSX1, PAX9 and EDA.



Contact information: Dr. Niko C. Bock, Department of Orthodontics, University of Giessen, Germany, niko.c.boock@dentist.med.uni-giessen.de

5.3.4 P2 European Orthodontic Society Congress 18.-22.06.2014, Warschau



Novel mutation in the EDA gene associated with non-syndromic oligodontia

G. Ruiz-Heiland¹, S. Jabir¹, N. Bock¹, W. Wende², D. Nolte³, S. Ruf¹

Departments of Orthodontics¹, Biochemistry² and Human Genetics³, University of Giessen

Conclusion

The novel *EDA* (c.866G>A) missense mutation causes oligodontia by interfering with protein interactions.

Introduction

Mutations in the *EDA* Gene are commonly associated with X-linked hypohydrotic ectodermal dysplasia, but mutations in this gene have also been described in association with non-syndromic tooth agenesis.

Aim

In the present study we describe a novel *EDA* mutation in two brothers presenting oligodontia.

Method

Two brothers suffering from oligodontia without unequivocal syndromic features as well as six consanguineous relatives were analyzed. The tooth agenesis pattern of the two brothers suggested a mutation of the *EDA* gene.

DNA was isolated from saliva, and the coding region of the *EDA*, *EDAR*, *EDARADD* and *WNT10a* genes as well as their intron-exon boundaries were analyzed for mutations (SNPs and Indels) using the software Mutation Surveyor v3.2 (SoftGenetics, USA). In addition, mutations were checked visually using the software ChromasLite 2.1 (Technelysium Pty Ltd.). SNPs were validated using the gene database (www.ensembl.org).

Results

The family pedigree (Fig. 3) revealed that the patients' mother (II:2) presented no dental abnormalities or agenesis whereas her father (I:1) had suffered from oligodontia. The mother has two more children with a second partner (II:3), a son (III:3) with normal dentition and a daughter (III:4) with hypodontia.

The mother has also one sister (II:4) without tooth agenesis, whose two daughters (III:5-6) present a normal dentition.

Gene sequencing revealed an *EDA* missense mutation (G>A transition at c.866), which results in a change from Arginine (CGC) to Histidine (CAC) at position p.289 (Fig. 4) corresponding to the TNF homology subdomain. The topology diagram of the *EDA* monomer indicates that this amino acid position is located on a beta hairpin and sticks out of protein core. The tridimensional surface representation of the *EDA* trimer shows that the location of the p.H289 could interfere with protein-protein contacts.

No other mutations were found in any of the genes analysed.

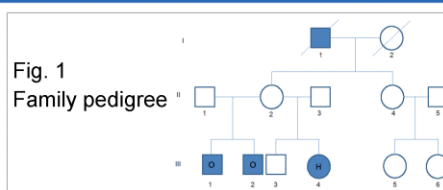


Fig. 1

Family pedigree



Fig. 2

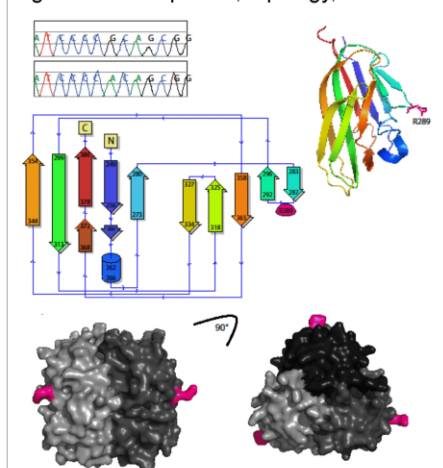
Patient III:1



Fig. 3

Patient III:2

Fig. 4 EDA - sequence, topology, 3D surface



Contact

sabine.ruf@dentist.med.uni-giessen.de

5.3.5 P3 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kieferorthopädie

10.-13.09.2014, München



JUSTUS-LIEBIG-
UNIVERSITÄT
GIESSEN

Nicht-syndromale Oligodontie: eine neue Mutation im EDA-Gen

N. Bock¹, G. Ruiz-Heiland¹, S. Jabir¹, W. Wende², D. Nolte³, S. Ruf¹

Poliklinik für Kieferorthopädie¹, Institute für Biochemie² und Humangenetik³, Justus-Liebig-Universität Giessen

Schlussfolgerung

Die neue Mutation des EDA-Genes (c.866G>A) bedingt eine Oligodontie durch Störung der Protein-Interaktionen.

Einleitung

Eine Mutation des EDA-Genes steht mit einer X-chromosomal erblichen, hypohydrotischen ektodermalen Dysplasie in Verbindung, wird aber auch mit nicht-syndromalen Aplasien von Zähnen assoziiert.

Ziel

Der Fallbericht beschreibt eine neue Mutation des EDA-Genes anhand von zwei Brüdern mit Oligodontie.

Methode

Zwei Brüder mit Oligodontie ohne eindeutig syndromale Eigenschaften sowie sechs Verwandte (Abb. 1) wurden untersucht. Das Nichtanlagenmuster der beiden Brüder (Abb. 2-3) lies eine Mutation des EDA-Genes erwarten.

Das genetische Screening der aus Speichel gewonnen DNA umfasste eine direkte Sequenzierung von PCR-Fragmenten der EDA-, EDAR-, EDARADD- und WNT10a-Gene (gesamte kodierende Region inklusive der Intron-Exon-Verbindungen). Die Untersuchung auf Mutationen (SNPs und Indels) wurde unter Anwendung der Software „Mutation Surveyor® v3.2“ durchgeführt. Außerdem wurden die Mutationen optisch mit Hilfe der Software „ChromasLite 2.1“ überprüft. SNPs wurden anhand der Gendatenbank „Ensembl“ (www.ensembl.org) validiert.

Ergebnisse

Der Stammbaum zeigt, dass die Mutter (II:1) keinerlei Nichtanlagen bleibender Zähne aufweist, ihr verstorbener Vater (I:1) jedoch eine Oligodontie hatte. Die Mutter hat zwei weitere Kinder mit einem zweiten Partner (II:3) einen Sohn (III:3), mit normaler Dentition und eine Tochter (III:4) mit Hypodontie. Die Mutter hat außerdem eine Schwester (II:4), welche ebenfalls keinerlei Nichtanlagen bleibender Zähne aufweist, ebenso wie deren beide Töchter (III:5-6).

Eine neue Mutation wurde im EDA-Gen in Exon 7 an Nukleotidposition 866 entdeckt (c.866G>A). Die Veränderung resultiert in einem Austausch von Arginin durch Histidin (p.R289H). Diese Aminosäureposition ist auf einem Beta-Hairpin lokalisiert und sticht aus dem Proteinkörper hervor (Abb. 4). Die dreidimensionale Oberflächendarstellung des EDA-Trimers lässt vermuten, dass die Veränderung an dieser Position die Protein-Protein-Interaktionen stört.

Bei keinem der beiden Brüder wurde eine weitere Mutation in einem der anderen untersuchten Gene entdeckt.

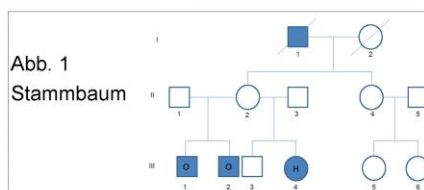
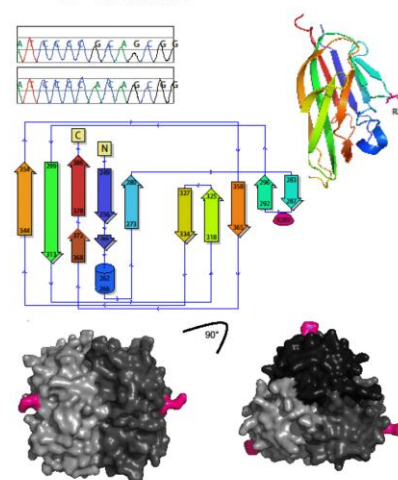


Abb. 4 EDA – Sequenz, Topologie und 3D-Oberfläche



Dieses Projekt wird mit Mitteln aus dem Wissenschaftsfond der DGKFO gefördert.

Kontakt

niko.c.bock@dentist.med.uni-giessen.de

5 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Sarah Jabir

6 Danksagung

Die Erarbeitung dieser Dissertation gelang nur mit der Unterstützung einiger Personen, denen ich an dieser Stelle herzlich danken möchte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Sabine Ruf. Ich danke Ihnen für die Überlassung des Dissertationsthemas und die hervorragende Betreuung. Die produktiven, engagierten sowie einfallsreichen Anregungen, ebenso Ihre Unterstützung auch im Rahmen der Vorträge, die während dieser Dissertation entstanden sind, waren ausgezeichnet.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Niko Bock, der mir während der Entstehung dieser Arbeit immer hilfsbereit und engagiert zur Seite stand.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Ruiz-Heiland für die Untersuchung der Speichelproben und ihre Geduld bei der Erläuterung von Vorgängen.

Herrn Dr. Wende gilt mein Dank für die Erstellung der Graphiken der EDA-Mutationen.

Meinen Kollegen aus der Klinikzeit danke ich dafür, dass sie mich vertreten haben, während ich die Probanden aufgesucht habe. Laura und Eddy, Ihr habt mir sehr geholfen, als wir in meine Wohnung eingebrochen sind, um den vergessenen Schlüssel zu holen, damit ich zu den Probanden fahren konnte. Vielen Dank dafür!

Ein weiterer Dank richtet sich an alle Studienteilnehmer, die sich viel Zeit genommen haben und alle miteinander sehr nett und terminlich flexibel waren.

Der größte Dank aber gebührt meiner Familie. Ich danke meinem Vater, dass er mit seiner Motivation und seiner Fürsorge dazu beigetragen hat, dass ich so weit gekommen bin. Du hattest immer ein offenes Ohr und hast mit großem Interesse die Entstehung dieser Arbeit verfolgt. Meiner Mutter danke ich für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft, für ihre Geduld und für die guten Ratschläge, die mir bei sehr vielen Entscheidungen geholfen haben. An dem Tag, als ich meinen Schlüssel in der Wohnung vergessen habe, bist Du, direkt als Du davon erfahren hast, trotz des Winterwetters in Paderborn losgefahren, um mir den Ersatzschlüssel zu bringen und

um mir letztendlich den Erhalt der Speichelproben einer Familie zu ermöglichen. Es ist unglaublich, was Ihr beide für mich getan habt. Ich danke Euch für Eure Unterstützung und dafür, dass Ihr mir das Studium und die Weiterbildung ermöglicht habt.

Meiner Schwester Susan möchte ich ebenfalls von Herzen danken. Du hast Dir immer viel Zeit genommen, um mich regelmäßig zu besuchen, wenn ich keine Zeit hatte zu Dir zu fahren. Mit dem Stopp auf der Fahrt von Münster nach Gießen hast Du mir sehr geholfen. Du hast mir oft zugehört, mich wieder aufgebaut und mir gute Tipps gegeben. Vielen lieben Dank dafür!

Meinem Freund Cornelius danke ich besonders für seine nie endende Geduld und die Aufrechterhaltung meiner Motivation während der gesamten Entstehungsphase dieser Dissertation. Vielen Dank für die unglaublich vielen Kilometer, die Du gefahren bist, damit wir uns sehen konnten und auch manches Mal nur, um mich wieder aufzubauen. Du hast mir gezeigt, was „Work-Life-Balance“ bedeutet.

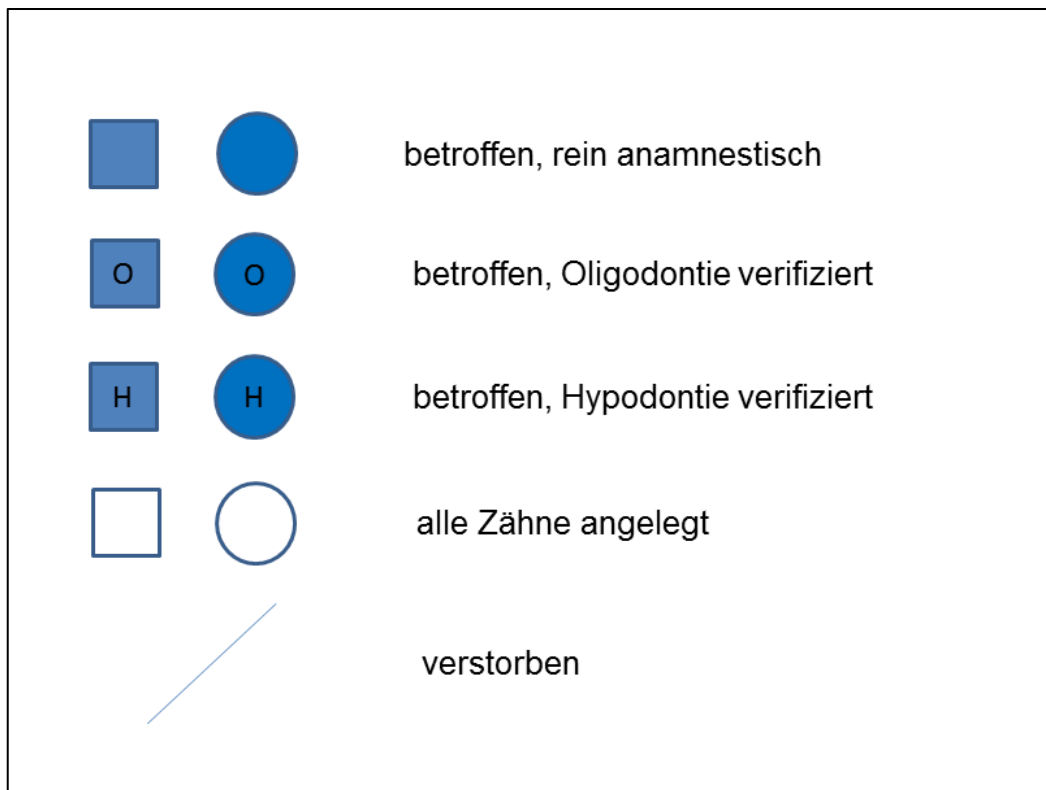


Abb.: Legende Familienstammbaum



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6333-7



9 17 8 3 8 3 5 19 6 3 3 3 7